

ÜBER DIE ADSORPTION VON PROTEINEN AN GRENZFLÄCHEN
IN ABHÄNGIGKEIT VON IHRER DENATURIERUNG

von

HANS EMIL MÜLLER

=

1964

ÜBER DIE ADSORPTION VON PROTEINEN AN GRENZFLÄCHEN
IN ABHÄNGIGKEIT VON IHRER DENATURIERUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

HANS EMIL MÜLLER

aus Zweibrücken

MAINZ 1964

Dekan: Professor Dr. K. Thomsen
Referent: Professor Dr. R. Duesberg
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1964



Gesamtherstellung: DITTERS BÜRODIENST MAINZ
Augustinerstraße 64-66

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Denaturierung von Proteinen	1
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Methoden der Denaturierung	2
C. Nachweis- und Untersuchungsmethoden der Denaturierung ..	5
D. Biologische Aspekte der Proteindenaturierung	6
E. Über den Mechanismus der Proteindenaturierung	8
2. Adsorption	12
A. Allgemeine Grundlagen	12
B. Adsorption von Proteinen an die Erythrocytenoberfläche ...	12
3. Die Adsorption von Proteinen an verschiedene Oberflächen- systeme in Abhängigkeit von der Denaturierung	13
A. Allgemeine Grundlagen	13
B. Hitzedenaturierung	14
C. Harnstoffdenaturierung	18
D. Denaturierung mit Ammonpersulfat	19
E. Diskussion	21
4. Experimenteller Teil	21
A. Material	21
B. Denaturierung durch Hitze, Harnstoff und Ammonpersulfat .	22
C. Adsorption	22
5. Zusammenfassung	23
6. Literatur	24

1. DENATURIERUNG VON PROTEINEN

A. Einleitung und Problemstellung

Die Denaturierung von Proteinen, speziell die Hitzedenaturierung und ihre Nutzenanwendung bei der Nahrungszubereitung, kannte man schon in prähistorischen Zeiten. Ihre Erkenntnis besitzt kulturgeschichtliche Bedeutung.

Trotz der eminenten Wichtigkeit dieses Themas und seiner Vielschichtigkeit umfaßt die Weltliteratur größenordnungsmäßig nur etwa 500 wissenschaftliche Arbeiten, die sich eingehend mit der Proteindenaturierung befassen. Die vorliegende Arbeit will die bis heute vorliegenden Ergebnisse kurz zusammenfassen und dazu einige neue Untersuchungen und Beobachtungen beisteuern.

Die Schwierigkeit des Themas wird bereits bei der Definition des Begriffes "Denaturierung" deutlich. Theoretisch mag man unter denaturierten Proteinen Stoffe verstehen, die sich in ihren chemischen, physikalischen oder biologischen Eigenschaften von den nativen Proteinen unterscheiden. Tatsächlich aber läuft das Problem der Proteindenaturierung auf die Frage hinaus, wie fein die Differenzierungskriterien bei Proteinen im allgemeinen sind. Die üblichen, bisher bekannten Methoden und Nachweisverfahren der Proteindenaturierung sollen geschildert werden. Im Anschluß daran wird eine neue, empfindliche Methode zur Erkennung der Proteindenaturierung anhand eigener Experimente beschrieben.

Entsprechend der Entwicklung neuer Untersuchungsverfahren verfeinerte sich der Begriff der Proteindenaturierung zusehends und letzten Endes wird damit das native Protein selbst nur noch durch negative Aussagen charakterisiert: Das native Protein ist ein Protein, an dem keine Denaturierungserscheinungen nachgewiesen werden können. Aber die umgekehrte, positive Aussage, daß das betrachtete Protein keine Denaturierungserscheinungen aufweist, bleibt unmöglich.

Allgemein läßt sich heute unter Proteindenaturierung jede Konstellations- (111) oder Konformationsänderung (129) an den Peptidketten und ihrer nächsten molekularen Umgebung definieren. Dabei stammt die Erkenntnis, daß eine Proteindenaturierung bereits durch eine Änderung des molekularen Milieus stattfindet, aus jüngsten experimentellen Befunden (107).

B. Methoden der Denaturierung

Man kann Proteine auf die verschiedenste Art denaturieren und deshalb "gibt es keinen gemeinsamen Denaturierungsmodus" (56). Die einzelnen Verfahren lassen sich vielleicht in Gruppen einteilen, deren denaturierte Endprodukte mehr oder weniger große Ähnlichkeit miteinander aufweisen. Ganz grob werden physikalische Eingriffe wie Hitze, Druck, mechanische Beanspruchung, energiereiche Strahlung oder Spreitung vom Einfluß chemischer Reagenzien mit und ohne direkte Reaktion an den reaktionsfähigen Proteingruppen unterschieden, wobei man sich stets darüber im klaren sein muß, daß in diesem Einteilungsschema einzelne Reaktionsschritte bei der einen oder anderen Proteindenaturierungsmethode wohl identisch sein und umgekehrt aus einem definierten Protein sehr verschiedene Endprodukte resultieren können.

Hitze: Die Hitzedenaturierung von Proteinen wurde von sehr vielen Untersuchern beschrieben, wobei die angeführte Literatur nur die letzten 15 Jahre einigermaßen vollständig erfaßt (2, 9, 21, 34, 37, 43, 50, 51, 56, 61, 67, 69, 76, 92, 96, 98, 103, 106, 118, 119, 123, 123, 140, 145, 146, 154, 156, 157, 161, 163, 170, 171, 183, 185, 186, 187, 193, 194, 197). Im übrigen muß auf ältere Sammelreferate (32, 149) verwiesen werden. Im Verlauf dieser Untersuchungen fand man, daß die Hitzedenaturierung eine Funktion des Wassergehaltes der Proteine ist. Trockene Proteine widerstehen der Hitzedenaturierung wesentlich besser (32).

Außerdem ist sie vom Druck abhängig, wobei man Drucke bis zu 7000 at untersuchte. Es zeigte sich eine Hemmung unterhalb und eine Förderung der Denaturierung oberhalb einer bestimmten für jedes Protein spezifischen Temperatur (96, 149, 193, 194).

Weiterhin ist die Hitzedenaturierung eine Funktion des pH-Wertes der Proteinlösung (122), ihres Salzgehaltes (55) und verschiedenster Zusätze zur Lösung. Besonders gut wurde der Einfluß von Caprylat auf die Hitzedenaturierung untersucht; die meisten Autoren fanden eine Hemmung (43, 119, 127, 157), ein Befund, der allerdings nicht unwidersprochen blieb (56). Auch andere Fettsäuren (123), etwa Nonylat (127), sollen vor Hitzedenaturierung schützen, ebenso Polyanionen, wie Ribonukleinsäure (2), Heparin (2), Polymannuronsäure (2), außerdem ATP (2, 140), das einen mit steigendem pH wachsenden Schutz bietet und Coenzym-Addukte, wie DPN + Sulfit (156) oder DPN · H₂ + Lactat (156). Basische Aminosäuren wiederum vermindern die Schutzwirkung von Fettsäuren (157) und Salze wie CaCl₂ oder MgCl₂ fördern die Hitzedenaturierung sogar (2).

Druck: Abgesehen von den Verhältnissen bei der Hitzedenaturierung von Proteinen unter hohem Druck existieren noch weitere Arbeiten über die Proteindenaturierung unter Druck (73, 83, 117, 136, 190, 188, 189), deren Aussagen den oben gemachten Angaben entsprechen.

Bestrahlung: Die Denaturierung von Proteinen durch Bestrahlung ist abhängig von der Energie bzw. der Wellenlänge der Strahlung. Es wurden Proteindenaturierungen mit ultrakurzen, elektromagnetischen Wellen mit einer Intensität von 50 - 2000 V/cm beschrieben (20, 57, 85), die in ihrer Wirkung wohl einer Hitzedenaturierung gleichkommen.

Nach einem anderen Denaturierungsmechanismus verläuft die Bestrahlung mit UV-Licht (3, 9, 54, 154, 208), mit Röntgen- und Korpuskulärstrahlen (8, 49, 53, 75) und schließlich auch mit Laser-Licht (100). Hier muß unterschieden werden zwischen einer Proteindenaturierung durch Aufnahme primärer Strahlungsenergie und den nachfolgenden Reaktionen des Proteins, hauptsächlich mit kurzlebigen Radikalen, die durch Cystein gehemmt oder durch hohe Salzkonzentrationen gefördert werden können (49).

Mechanische Kräfte: Mechanische Kräfte können zur Protein-Denaturierung führen. Ihre Einwirkung erfolgt in Form intensiver, mechanischer Vibrationen, etwa als Schall- und besonders als Ultraschallwellen (65, 99, 149, 160). Dabei muß aber stets infolge der adiabatischen Prozesse auch mit einer Hitze-Denaturierung gerechnet werden.

Eine andere Form mechanischer Denaturierung ist das Zerreiben trockener Proteine (31) oder das Schütteln von Proteinlösungen (26, 27, 34), wobei n-Heptylalkohol diese Art der Denaturierung hemmen soll (26). Auf einem ähnlichen Wirkungsmechanismus beruht wohl auch die Protein-Denaturierung durch

Oberflächenspreitung, die sich an den Grenzflächen zweier verschiedener Phasen abspielt (40, 69, 77, 78, 79, 80, 195). Aromatische Diamidine wie Stilbamidin, Propamidin oder Bisamidonomethylbenzyl hemmen diese Oberflächendenaturierung. Nukleinsäuren fördern sie im Gegensatz zur Hitze-Denaturierung, bei der eine Hemmwirkung der Nukleinsäuren bekannt ist (109).

Die denaturierende Eigenschaft aller chemischen Stoffe ist letztlich Folge von Umsetzungen, die diese Substanzen mit dem Protein eingehen. Dabei brauchen die Denaturierungsreaktionen keine Reaktionen im chemischen Sinn zu sein, die zu neuen, chemischen Individuen führen; zur Denaturierung ge-

nügen bereits Umlagerungen, die nur als Konformationsänderungen beschrieben werden können (129). Allerdings ist es schwer, eine Grenze zu ziehen zwischen Reaktionen, die nur zu Lage- und Stellungsveränderungen von Atomgruppen am Proteinmolekül führen und Umsetzungen, die neue, chemische Stoffe ergeben.

Wasserstoff- und Hydroxylionen: Alle nativen Proteine besitzen einen pH-Bereich, in dem sie stabil sind. Außerhalb dieser "Indifferenzzone" (24), die meist zwischen pH 4,5 - 10 liegt, werden sie denaturiert. Das geschieht durch H-Ionen im sauren Bereich (12, 23, 24, 56, 62, 63, 67, 91, 92, 104, 103, 124, 153, 193, 199, 203, 192) und durch OH-Ionen im basischen Bereich (9, 23, 24, 56, 67, 84, 91, 93, 104, 153, 164, 165, 193, 199, 203).

Die Oxydation von Proteinen mit molekularem Sauerstoff, mit Methylenblau oder Ferricyanid verläuft in alkalischem Medium (pH 3,4 - 13) besonders gut (164), die Oxydation mit Perameisensäure in saurem Medium führt hauptsächlich zu Disulfid- und Sulfonsäure-Gruppierungen (95).

Salze: Auch die Denaturierung mit anorganischen Salzen wie LiCl (13), LiBr (16), NaCl (93, 201), Na_2HPO_4 (201), NaH_2PO_4 (201), KCl (93), KCN (204), KCNS (56, 91, 201, 203), Na_2SO_4 (201), MgCl_2 (13, 201, 203), CaCl_2 (13, 93, 201), BaCl_2 (201), AlCl_3 (123), FeCl_3 (13, 123), CuCl_2 (13), HgCl_2 (104), HgHO_3 (123), $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ (13), Chromsalzen (30) oder organischen Salzen wie Natrium-Benzozat (203), Natrium-Salizylat (93, 203) oder Paraaminosalizylat (59, 60) ist möglich.

Hydrolyse: Oft ist mit der Einwirkung von H- oder OH-Ionen eine Hydrolyse verbunden (192), sie verläuft analog wie andere Umsetzungen in schwerem Wasser verzögert (133). Ohne äußerlich in Erscheinung tretende, im Reaktionsablauf aber durchaus mögliche und vorhandene H- oder OH-Ionenwirkung (101, 102) kann die Denaturierung durch Enzymhydrolyse verlaufen (28, 150, 151, 173, 186).

Die Denaturierung bei der Biuret-Reaktion scheint kombiniert zu verlaufen, wobei sowohl die OH- wie auch die anderen Ionen mitwirken (4).

Organische Substanzen wie Alkohol (13, 45, 154), Aceton (104) oder höhere Alkohole (199) führen bei Zusatz zu wässrigen Proteinlösungen zu einer Denaturierung, die unter Koagulation am isoelektrischen Punkt verläuft.

Viele Stoffe mit Amid-Gruppierungen im Molekülaufbau erwiesen sich als besonders intensive Denaturierungsmittel, so etwa Harnstoff (12, 14, 32, 42, 53, 67, 77, 78, 91, 107, 108, 112, 131, 132, 133, 134, 135, 137, 156, 173, 182, 191, 198, 199, 202, 209), Guanidiniumsalze (56, 108), Thioharnstoff (5, 133), Thioacetamid (5), Carbamate (5), Formamid (203), Acetamid (203) oder Mercaptoacetanilide (206).

Oberflächenaktive Stoffe: Relativ neu ist die Proteindenaturierung mit oberflächenaktiven Stoffen, vor allem synthetischen Netzmitteln (19, 40, 31), unter anderem auch mit Gallensalzen (3).

Die Wirkung aliphatischer Amine (64) und des Pyridins (92) als denaturierende Agenzien mögen teilweise auf einen pH-Effekt zurückgehen, ebenso die Wirkung organischer Säuren wie Ameisensäure (91), Essigsäure (91, 93, 123) oder Milchsäure (91).

Daß typische Eiweißfällungsmittel wie Trichloressigsäure, Sulfosalizylsäure, Pikrinsäure, aber auch Phosphorwolframsäure (123), Tanninsäure oder Phenol (5) ebenfalls denaturieren, ist zwar selbstverständlich, der Mechanismus dieser Denaturierungen ist aber noch ungeklärt.

Denaturierend auf Proteine wirken schließlich alle chemischen Substanzen, die mit Proteinen Reaktionen eingehen und zu chemisch veränderten Individuen führen, wie etwa p-Chlormerkuribenzoat (178), Monojodacetat (178), salpetrige Säure (200) bzw. Diazo-Reagenzien (1, 69), Keten, das acylierend wirkt (69) oder Formaldehyd (50, 51, 104, 125, 203). Hier wie auch im vorhergehenden Teil sind die Grenzen fließend und berühren sich mit dem umfangreichen Thema der chemischen Modifikationsmöglichkeit von Proteinen.

C. Nachweis- und Untersuchungsmethoden der Denaturierung

Die Methoden zum Nachweis der Proteindenaturierung schließen sich eng an die allgemeinen Reinheitskriterien für Eiweißkörper an, die durch Löslichkeit, elektrophoretische Beweglichkeit, Sedimentation in der Ultrazentrifuge, Diffusion, Lichtzerstreuung, Absorptionsspektrum, optische Rotation, Kristallisation, biologische Aktivität, immunologisches Verhalten und den Daten aus der Aminosäureanalyse und der Aminosäuresequenzanalyse gegeben sind.

Entsprechend verfolgte man die Proteindenaturierung durch Trübungsmessung (5, 140), durch Untersuchung der relativen Löslichkeit (103), der Viskosität (23, 46, 50, 89, 92, 93, 94, 159, 183, 185, 197), des viskoelastischen Verhaltens (102), der Elastizität (76), der Änderung in der Ultraviolett-Absorption (65, 139) und der Ultrarot-Absorption (47), der Fluoreszenz (125), des optischen Rotationsverhaltens (7, 68, 93, 125, 137, 159, 174, 180, 186, 197, 138), der optischen Rotationsdispersion (94), der Lichtzerstreuung (43, 81, 184), der Strömungsdoppelbrechung (46, 81), der Sedimentation in der Ultrazentrifuge (59, 60), der elektrophoretischen Beweglichkeit (21, 126), der Streuung von Röntgenstrahlen (6, 38, 45, 181), des pKa-Wertes (107), des Temperaturkoeffizienten der Hochfrequenzinduktivität (191), der Enthalpieänderung (137), des polarographischen Verhaltens (22, 54), der Reaktivität struktureller Gruppen an Proteinen ganz allgemein (173), ihrer Reduktionsfähigkeit (93), der Jodacetat-Bindung (41) und der Sulfhydrylgruppenanalyse (9, 46, 149, 211). Eine Reihe von Arbeiten beschäftigt sich mit dem Bindungsvermögen denaturierter Proteine (37) für verschiedene, niedermolekulare Stoffe wie H-Ionen (171), Farbstoffe (13, 35), ³⁵S-Methionin (154) und Quecksilberjodid (123).

Im Gegensatz zu diesen Publikationen beschreibt die vorliegende Arbeit die Adsorbierbarkeit von Proteinen an verschiedenen Grenzflächen in Abhängigkeit von ihrer Denaturierung.

Auch mit biologischen Testen läßt sich die Proteindenaturierung verfolgen. So nimmt etwa die Enzymaktivität (8) ab, wie man bei Urease (161), Alkoholdehydrogenase, Muskel-glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (173), Lipase (152) oder Trypsin (3) zeigen konnte. Umgekehrt steigt die Verdaubarkeit denaturierten Proteins (28, 150, 136, 133) für Proteinasen, so daß sich darauf eine Testmethode aufbauen ließ (151).

D. Biologische Aspekte der Proteindenaturierung

Neben der Zunahme der Enzymhydrolyse bei denaturierten Proteinen und der Abnahme der Aktivität bei denaturierten Enzymen wurde noch eine ganze Reihe anderer biologischer Phänomene im Zusammenhang mit einer möglichen Denaturierung untersucht.

So brachte man die spezifische Wirkung von Anti-Malariamitteln (130), von Fungiciden (104), von Trypanociden (39) und von dem Tuberkulostatikum p-Aminosalizylsäure (PAS) (59) (60) mit einer möglichen Denaturierung ent-

sprechender Proteine in Zusammenhang, ohne dabei jedoch zu schlüssigen Ergebnissen zu gelangen.

Auch die Funktion bzw. die veränderte Funktion verschiedener organischer Gewebe wurde hinsichtlich einer Denaturierung der Zellproteine studiert. Das geschah bei akut ermüdetem Herzmuskelprotein, an dem parallel mit der Ermüdung der Nachweis einer Proteindenaturierung gelang, die charakterisiert war durch eine Veränderung von chemischen Gruppen und einem Ansteigen der proteolytischen Enzyme (36).

Bei Nervenproteinen ließ sich in ähnlicher Weise eine Beziehung zwischen ihrer funktionellen Kapazität und einer reversiblen Denaturierung aufdecken (17).

An den Epithelzellen der Froschschwimmhaut beobachtete man bei Denaturierung durch H-Ionen, Hitze oder Kälte ein Sinken der Permeabilität für Farbstoffe bestimmten Dispersionsgrades, nicht dagegen bei Denaturierung durch OH-Ionen und Harnstoff (67).

Eine weitere interessante Untersuchung (121) erklärt das Auftreten von Frostschäden mit einer Denaturierung entsprechender Proteine, wobei angenommen wird, daß beim Gefrieren protoplasmatisch gebundenes Wasser als Eis aus den Eiweißkörpern entfernt wird. Dadurch nähern sich einander einzelne Peptidketten, die vorher durch Wasserhüllen voneinander getrennt waren. Es können sich intermolekulare S-S-Brücken bilden, wie das auch bei vielen anderen Proteinreaktionen als entscheidender Schritt bekannt ist (90).

Ebenfalls auf einer Alteration von Sulfhydrylgruppen soll die denaturierende Wirkung von Tabakrauch beruhen, wie am Modellsystem des β -Lactoglobulins gezeigt wurde (162). Dabei hemmte Tabakrauch die über einen SH-Mechanismus ablaufende Wärmeaggregation des Proteins (90). Ein an SH-Gruppen reiches Filtermaterial wie etwa reduzierte Wolle verminderte die Proteinschädigung durch Zigarettenrauch um ca. 50%.

Unter Einfluß von Säuren, Basen, Salzen, Aminen, Ölen und Chlormethan-Derivaten ergab sich, daß die Auslösung einer Entzündung und die folgende Nekrose der Fähigkeit dieser Stoffe zur Proteindenaturierung parallel verläuft (153). Ähnliche Beziehungen scheinen zwischen hautreizenden und proteindenaturierenden Effekten von oberflächenaktiven Substanzen zu bestehen (19).

Bei der Alteration von Hefezellproteinen durch denaturierende Agenzien wurde bei weit gestreuter Prüfung denaturierender Substanzen gefunden, daß

zwar bei einer Gruppe von Stoffen - dazu zählen außer den oben angeführten (153) noch Alkohol, Aceton und Phenol - die Denaturierung ihrer fungiciden Wirkung entspricht, nicht dagegen bei Formaldehyd und HgCl_2 (104). Wie empfindlich jedoch die Methoden zur Erkennung der Denaturierung gerade in diesem Fall waren, bleibt dahingestellt, zumal die ausgesprochen denaturierende Wirkung von Formaldehyd und Sublimat bekannt ist. - Eine Diskrepanz zwischen biologischer Wirksamkeit und der Fähigkeit zur Denaturierung, allerdings auf Grund eines völlig anderen Wirkungsmechanismus, wird bei Dinitrophenol beschrieben (179).

Weiterhin führte man die bakterielle Lumineszenz auf eine reversible Proteindenaturierung zurück (97).

Bei der Virusentstehung in *Bombyx mori* wurde synchron dazu das Auftreten von denaturierten Proteinen gefunden, das man durch Sulphydrylgruppenanalyse nachwies (210). Auch die Carcinogenese brachten Untersucher mit der Proteindenaturierung in Zusammenhang (166) und die carcinogenen Nitrosamine wurden als Denaturierungs-Agenzien getestet (5). Wie kritisch sich die angeführten Publikationen mit diesem Problem auseinandersetzten, muß offenbleiben.

Schließlich betrachtete man auch die Antigeneigenschaften denaturierter Proteine (52, 69, 124, 167, 159, 207), wobei sich zeigte, daß im allgemeinen die Antigen- und Antikörpereigenschaften bei der Denaturierung der Proteine zunächst erhalten bleiben. Allerdings ist auch eine Antikörperaktivierung ohne sonstige, merkbare Denaturierung des Proteins möglich (10, 11, 75). Zusätzlich steigt aber bei denaturierten Antikörpern die Bindungsfähigkeit für das Antigen um den Faktor 3 - 4 an, wodurch sich das Problem in unübersichtlicher Weise kompliziert (207).

E. Über den Mechanismus der Proteindenaturierung

Der nun folgenden Besprechung des Denaturierungsvorganges, wie er sich aus den oben beschriebenen Methoden und unter Nachweis mit den aufgezählten Untersuchungsverfahren darstellt, muß eine kurze Beschreibung des Modells eines globulären Proteins nach den heutigen Anschauungen vorangehen.

Man nimmt an, daß sich die Polypeptidketten, deren Aminosäuresequenz als Primärstruktur bezeichnet wird, meist in einer Helixform über Wasserstoffbrückenbindungen und unter Umständen auch über Disulfidbindungen zusammenfalten und so die Sekundärstruktur bilden. Diese Sekundärstruktur faltet sich ihrerseits nun zu einem starren Gebilde, der Tertiärstruktur, die eben-

falls durch Aminosäurereste stabilisiert wird (129). Die Diskussion des Denaturierungsvorganges gliedert sich sinngemäß in verschiedene Abschnitte, denn es gibt keinen allgemeingültigen Denaturierungsmechanismus, der überall Anwendung finden könnte (56). - Im folgenden soll die Denaturierung durch Hitze, durch oberflächenaktive Stoffe, durch Säuren und Basen und endlich durch Harnstoff einzeln besprochen werden, denn nur auf diese Denaturierungsmodalitäten beschränkt sich das Schrifttum.

Lange Zeit wurde die Denaturierung auf Grund ihres hohen Temperaturkoeffizienten als eine Ein-Schritt-Reaktion angesehen, die dem Alles-oder-Nichts-Gesetz folgt (32) und keine Zwischenstufen zwischen dem nativen und dem denaturierten Protein kennt. Diese Anschauung konnte sich solange halten, bis mit feineren Untersuchungsmethoden verschiedene Denaturierungsschritte aufgezeigt wurden (177). Davon scheinen die ersten Reaktionsstufen reversibel zu sein. Die Reversibilität der Denaturierung wird von vielen Untersuchern beschrieben (7, 13, 17, 24, 30, 33, 66, 97, 108, 126, 147, 148, 175, 193, 194). Sie ist bei fibrillären Proteinen wie Seidenfibroin (33) oder Kollagen (48, 110), aber auch bei Ribonuklease beschrieben und sie bleibt allgemein solange erhalten, wie keine Disulfid-Brücken aufgebrochen werden (66). Denaturierungen in Abhängigkeit von Druck und Temperatur zeigten charakteristische Gleichgewichtseinstellungen (193, 194). Bei Normaldruck fand sich eine Protein-spezifische Übergangstemperatur, oberhalb der die Denaturierung einsetzt, unterhalb der sie wieder rückgängig werden kann. Sie läßt sich beim Vorhandensein von Wasserstoffbrückenbindungen scharf definieren, sie wird beim Vorliegen anderer Bindungen verbreitert (175). Auch bei der Harnstoff- oder Guanidin-Denaturierung konnte eine derartige Reversibilität des ersten Schrittes festgestellt werden (108).

Theoretisch läßt sich die weitergehende irreversible, thermische Proteindenaturierung entsprechend der Theorie von MIRSKY und PAULING (139) als ein Übergang von einem Zustand höherer Ordnung in einen Zustand niedrigerer Ordnung bei einem Hochpolymeren beschreiben (34).

Je nach angewandter Temperatur wurden nur ein einziger oder aber mehrere Reaktionsschritte beschrieben. Bei hoher Temperatur verläuft die Denaturierung "verschmiert" in einem einzigen Reaktionsschritt (145) oder in mehreren Stufen.

Die schrittweise Denaturierung beginnt mit Aufweitung und Volumenvergrößerung des Proteinmoleküls (56). Als Grundlage dieses Vorganges scheinen sich nur Wasserstoffbrückenbindungen zu lösen (116). Dabei erfordert der

Aktivierungsprozeß mit einer bestimmten Aktivierungsenergie (32, 113) die Ruptur einer kritischen Zahl von H-Brücken, bis sich die Helixketten der Sekundärstruktur relativ frei bewegen können (116). Dem Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen folgt eine Hydratation der aufgebrochenen Bindungen und damit eine Ausdehnung des Moleküls (163). Als nächster Schritt wird eine Trennung elektrostatischer Ladungen in der frei beweglich gewordenen Peptidkette diskutiert, die Änderungen in der Bindung von Ionen zur Folge hat (163). Danach läßt sich eine Aggregation von verschiedenen Molekülen annehmen (89). Hierbei können prinzipiell alle aufgebrochenen Bindungen wieder neue Kuppungen herbeiführen. So mögen intramolekulare in intermolekulare Wasserstoffbrücken umgewandelt werden (93). Außerdem kommen zusätzlich Disulfidbrücken in Frage, bei denen die Knüpfung der S-S-Bindung nach Art einer Kettenreaktion durch eine einzige Sulfhydrylgruppe gestartet werden kann, ein Reißverschlußreaktionsmechanismus, den man u. a. auch bei der Blutgerinnung diskutiert (90). Bei einer derartigen Aggregation schließen sich die Proteine der verschiedensten Herkunft zusammen (33). Läuft schließlich die Denaturierung noch weiter, so erhält man Koagulation und Gelbildung (32, 133). Den Vorstellungen durchaus entsprechend ist die Beobachtung, daß der Denaturierungsprozeß noch einige Zeit nach erfolgter Erhitzung weiterläuft (103). Das Reaktionsende, an dem ein koaguliertes Protein steht, ist thermodynamisch durch seine Enthalpieänderung gekennzeichnet, die ihrerseits pH-abhängig ist (32, 137). Charakteristisch für denaturierte Proteine ist eine allgemein erhöhte Reaktionsfähigkeit ihrer chemisch funktionellen Gruppen, wie etwa der Sulfhydrylgruppierung (74, 149). Hinsichtlich der Reaktivität phenolischer Hydroxylgruppen widersprechen sich verschiedene Untersucher (149, 172).

Die Oberflächendenaturierung der Proteine verläuft in den ersten Schritten bis zum Aufbrechen der H-Brücken ähnlich wie die thermische Denaturierung, der dann allerdings keine Aggregation folgt. Am Beispiel des Pepsins konnte die Struktur eines oberflächendenaturierten Proteins untersucht werden (93); durch die Berechnung der freien Energie eines monomolekularen Filmes ließ sich die für die Denaturierung aufzuwendende Energie bestimmen (195).

Für die Säure-Basen-Denaturierung außerhalb der Indifferenzzone (pH 4,5 - 10,0) besteht der erste Schritt als reversible Reaktion wahrscheinlich in einer stöchiometrischen Salzbildung der Amino- oder Carboxylgruppen mit Säure oder Alkali. Daran anschließend kann es zuerst zu einem Zerfall in einige kleinere Molekülfragmente kommen, wie etwa beim Hämoglobin (155) oder Albumin (205). Darauf folgend oder unmittelbar an das Stadium der Salzbildung

anschließend entstehen dann Micellen und es tritt wieder Gelvernetzung ein (24). Die mathematische Behandlung der Säure-Basen-Denaturierung erfolgte in zwei Publikationen (63, 165).

Auch die Harnstoff-Denaturierung, die besonders intensiv untersucht wurde, läßt sich in verschiedene Schritte aufgliedern (15, 196, 197).

Aus Analogiebetrachtungen an dem Proteinmodell des Dimethylamino-polyvinyl-pyrrolidons fand man anhand von pK_a -Messungen, daß der allererste Angriff des Harnstoffs in einer Störung der eisähnlichen Hydrathülle um das Makromolekül mit seinen zahlreichen, unpolaren Gruppen zu suchen ist. Obwohl bei dieser Störung der Wechselwirkung zwischen dem Lösungsmittel und dem darin gelösten Makromolekül noch keine intramolekularen H-Brückenbindungen alteriert werden (wenn man davon absieht, daß auch zwischen dem Makromolekül und seiner Hydrathülle Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind), so muß doch hierin bereits ein wesentlicher Schritt der Proteindenaturierung gesehen werden (107). Wie bei der Hitzedenaturierung fand man auch bei der Denaturierung mit Harnstoff eine Aufweitung des Moleküls (23, 42, 132). Sie soll bei globulären, symmetrischen Molekülen geringer sein als bei asymmetrischen, die ein stark differierendes Achsenverhältnis aufweisen (29).

Bei relativ geringen Harnstoff-Konzentrationen bleibt die Denaturierung an einem Punkt stehen, der als "Pseudogleichgewicht" gekennzeichnet wurde (193). Die soweit abgelaufene Denaturierung bezeichnete man entsprechend als "Prädenaturierung" (14, 193). Dabei soll nur ein Teil der schwächeren Bindungen des Proteins aufbrechen (12). Die freien Strukturelemente bleiben dabei in der Lage, sich wieder miteinander zu verbinden. Weil dies unter den denaturierenden Bedingungen, also in der Harnstofflösung, schwierig ist, resultieren H-Brücken mit größerer Bindungsstärke als die zuvor aufgebrochenen. Im Endeffekt kommt durch die Denaturierung eine gewisse Stabilisierung als "Prädenaturierung" zustande (199). Läuft die Denaturierung bei höherer Harnstoffkonzentration weiter, so erfolgt auch hier eine Aggregation (134), die nach den gleichen Reaktionsmechanismen wie bei der Hitzedenaturierung erfolgt. Dabei hemmt NaCl (169) und Natrium-Dodezylsulfat (44) die Denaturierung. Eine Hydrolyse scheint im allgemeinen mit der Denaturierung nicht verbunden zu sein.

2. ADSORPTION

A. Allgemeine Grundlagen

Die vorliegende Arbeit untersucht die Adsorbierbarkeit verschiedener Proteine an aktiven Oberflächen in Abhängigkeit von ihrer Denaturierung. Als Grundlage dienen die Adsorptionsgesetze von LANGMUIR (114, 115) und FREUNDLICH (210). LANGMUIR leitete Beziehung (1) rein theoretisch aus dem Massenwirkungsgesetz ab:

$$b = \frac{a}{c(a_{\max} - a)} \quad (1)$$

Dabei ist b die spezifische Oberflächenaktivität, a der an der Oberfläche adsorbierte Stoff, $a_{\max}$ die maximale Oberflächenadsorption des betreffenden Stoffes und c die Konzentration des Stoffes in der Lösung. Wie sich leicht aus Bez.(1) ergibt, wird die adsorbierte Menge a für $a \ll a_{\max}$ der Konzentration c proportional. Für $a \approx a_{\max}$ wird die adsorbierte Menge a unabhängig von der Konzentration c in der Lösung eine konstante Größe. Obwohl die LANGMUIR'sche Adsorptionsisotherme streng aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet ist, entspricht sie den experimentellen Befunden relativ schlecht.

Die von FREUNDLICH empirisch aufgefundene Adsorptionsisotherme Bez.(2)

$$a = k \cdot c^{1/n} \quad (2)$$

beschreibt das Adsorptionsverhalten vieler Systeme wesentlich besser. Hierbei ist a die bei der Konzentration c adsorbierte Substanzmenge, wenn k und n Systemkonstanten darstellen.

Die Diskrepanz zwischen den beiden Adsorptionsisothermen erklärt man sich durch eine Überlagerung mehrerer LANGMUIR-Isothermen zu einer einzigen FREUNDLICH-Isotherme.

B. Adsorption von Proteinen an die Erythrocytenoberfläche

Der spezielle Fall der Proteinadsorption an die Oberfläche von Erythrocyten wurde bereits von vielen Untersuchern beschrieben. Dabei fand man ein Adsorptionsverhalten, das der FREUNDLICH'schen Adsorptionsisotherme entspricht (70, 71, 36, 37, 105, 141, 142, 143, 144). Im einzelnen ergab sich für die verschiedenen Proteine ein etwas differierendes Verhalten. Außer stoffspezifischen Eigenschaften und der Konzentration besitzen noch folgende Faktoren

Einfluß auf die Adsorptionsfähigkeit von Proteinen an die Erythrocytenoberfläche:

- a) der pH-Wert der Lösung. Im sauren Bereich etwa zwischen pH 4 - 5 wurde ein starkes Ansteigen der Adsorption (bis zum zehnfachen Wert des physiologisch-neutralen Mediums) in isotoner Phosphatpufferlösung bei allen untersuchten Plasmaproteinen (Human-Albumin, Human-Fibrinogen, Human-gamma-Globulin, Human-alpha₂-Makroglobulin, Human-Präalbumin und Human-Transferrin) beobachtet (72).
- b) Die Ionenstärke der Lösung. Ersetzt man in einer isotonen NaCl-Lösung die Na- und Cl-Ionen sukzessiv durch nicht-ionisierte, neutrale Moleküle, etwa Glukose, ohne dabei die Isotonie der Lösung selbst zu verändern, so ergibt sich mit sinkender Ionenstärke eine steigende Adsorption des Proteins an die Erythrocytenoberfläche (72).
- c) Die Temperatur der Lösung. Je nachdem, ob die Adsorption ein end- oder exergonischer Prozeß ist, findet sich mit steigender oder sinkender Temperatur eine wachsende Adsorption des Proteins an die Erythrocytenoberfläche (72). Von wesentlicher Bedeutung ist in diesem Zusammenhang wieder die Denaturierung der Eiweißkörper. So reagieren etwa native Rh-Antikörper exotherm, dagegen ¹³¹Jod-markierte endotherm.
- d) Die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts. Von verschiedenen Untersuchern wurde gefunden, daß sich das Gleichgewicht erst nach 30 - 180 min eingestellt hat (72, 86, 176).

3. DIE ADSORPTION VON PROTEINEN AN VERSCHIEDENE OBERFLÄCHENSYSTEME IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DENATURIERUNG

A. Allgemeine Grundlagen

Die Adsorption von Proteinen an die Erythrocytenoberfläche im allgemeinen und ganz besonders die Adsorption von verschieden stark denaturiertem Protein an die Erythrocytenoberfläche ist deshalb von so hoher biologischer Bedeutung, weil man in diesem Vorgang den Modellversuch für einen Schritt des Eiweißmetabolismus sehen mag, der bis heute sehr geringe Aufmerksamkeit erfahren hat.

Aus rein theoretischen Erwägungen kann man zu dem Schluß gelangen, daß jeder Elimination von Plasmaproteinen aus der Blutbahn ein Adsorptionsvorgang an irgendeiner biologisch aktiven Zelloberfläche vorangehen muß. Und

diese Adsorption gehorcht mit großer Wahrscheinlichkeit den gleichen Adsorptionsbedingungen, die zwischen Plasmaproteinen und Erythrocytenoberflächen untersucht wurden. Denn allein in der Erythrocytenoberfläche stehen uns relativ große und homogene Zelloberflächen in dem homologen System der entsprechenden Plasmaproteine für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung. Die daraus ermittelten Beziehungen zwischen Adsorptionsfähigkeit und Denaturierungsgrad bei einem Protein bieten möglicherweise einen Anhaltspunkt für das Verständnis der Kriterien und des Wirkungsmechanismus, nach denen Plasmaproteine aus der Blutbahn eliminiert werden.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Abhängigkeit der Adsorption verschiedener Proteine von ihrer Denaturierung an drei verschiedenen Oberflächensystemen, an menschlichen Erythrocyten, an Aktiv-Kohle und an Partikeln von vernetztem Polyaminostyrol. Auch die Proteindenaturierung erfolgte nach drei verschiedenen Verfahren, durch Hitze, mit Harnstoff und mit Ammoniumpersulfat. Diesem Untersuchungsmodus entsprechend gliedert sich das Thema in drei Abschnitte auf. Zuerst sollen die Ergebnisse der Adsorption hitzedenaturierter Proteine besprochen werden, denen die Resultate mit Harnstoff- und Ammoniumpersulfat-denaturierter Proteine anschließen.

B. Hitzedenaturierung

Im folgenden wird die Adsorption thermisch denaturierter Proteine an verschiedene Oberflächen beschrieben. Dabei erfolgte die Hitzeeinwirkung auf Proteinlösungen in physiologischer NaCl-Lösung verschieden lange Zeit. Die prozentualen Adsorptionswerte auf der Ordinate in Abb. 1-9 geben stets an, wieviel Prozent von der Gesamtmenge des im Ansatz vorhandenen Proteins an die entsprechende Oberfläche adsorbiert wurden. Konventionell kamen stets 20 mg Aktiv-Kohle und 20 mg Polyaminostyrol zur Verwendung. Die Erythrocytenmengen schwankten in den einzelnen Ansätzen. Deshalb sind nicht so sehr die Absolutgrößen als vielmehr die relativen Adsorptionsveränderungen in Abhängigkeit von der Denaturierungsdauer in Minuten - auf der Abszisse - von Bedeutung.

Das Verhalten von Human-Albumin, Human-gamma-Globulin und Streptolysin 0 geht aus Tab. 1 und den Abb. 1-9 hervor. Dabei zeigte sich beim Albumin bei den untersuchten Temperaturen von 70, 75 und 80°C und bei den Oberflächensystemen Erythrocyten, Aktiv-Kohle und Polyaminostyrol jeweils der gleiche Trend: Die Adsorption von Albumin steigt in Abhängigkeit von der Denaturierung an. Das ist bei einer Erhitzung auf 70°C nur in geringerem

Ausmaß der Fall, deutlicher bei 75 und 80°C. Betrachtet man die Kurven im einzelnen, so ergibt sich bei der Behandlung bei 70°C ein wesentliches Ansteigen der Adsorptionskurven erst bei relativ langer Hitzeeinwirkung. Bei Polyaminostyrol schon bei einer Temperatureinwirkung von 70°C, bei Erythrocyten und Aktiv-Kohle deutlicher erst bei 75 und 80°C steigt die Adsorption bereits nach einer Erhitzungsdauer über eine halbe Minute stufenförmig auf ein erhöhtes Niveau, bleibt dort etwa 10 min stehen oder sinkt noch einmal kurz ab, um dann bei längerer Hitzeeinwirkung weiter anzusteigen. Für die 30°C-Kurven zeigt sich kein weiterer Anstieg nach dem 10-Minuten-Niveau mehr, die Hitzedenaturierung scheint unter den gegebenen Bedingungen damit abgeschlossen zu sein.

Auch beim Human-gamma-Globulin findet sich eine mit länger dauernder Hitzeeinwirkung steigende Adsorption. Es lassen sich genau wie beim Albumin in den meisten Fällen ganz charakteristische Adsorptionsmaxima und -minima bei kurzer Wärmeapplikation (0,5 - 5 min) feststellen, die sich bei längerer Versuchsdauer nicht mehr wiederholen.

Als drittes Protein wurde Streptolysin 0 bei 60 und 70°C hintzedenaturiert. Ähnlich wie bei Human-Albumin und Human-gamma-Globulin, aber noch viel deutlicher ausgeprägt, finden sich beim Streptolysin 0 bei kurzer Hitzeeinwirkung deutliche Kurvenmaxima und -minima. In dieser "Initialschwankung" der Adsorptionskurven erkennt man bei Kohle und Polyaminostyrol zuerst deutliche Minima, denen weniger ausgeprägte Maxima folgen. Umgekehrt verhält sich das Streptolysin 0 der Erythrocytenoberfläche gegenüber. Hier steigen die Kurven zuerst zu Maxima an, denen dann erst weniger deutliche Minima folgen.

Überblickt man das Adsorptionsverhalten der drei untersuchten Proteine gegenüber den drei verschiedenen Oberflächensystemen nach verschieden langer Hitzeeinwirkung, so läßt sich folgendes feststellen:

- a) Die Adsorption von hitzedenaturiertem Protein an beliebige Oberflächensysteme ist abhängig von der betreffenden Oberfläche. Sowohl stärkere Adsorption, aber auch schwächere Adsorption, als sie dem unbehandelten Protein entsprach, wurde beobachtet.
 - b) In 14 von 15 untersuchten Fällen fand sich die beschriebene "Initialschwankung" der Adsorptionskurven mit ausgeprägten Kurvenmaxima und -minima.
- Als Bestätigung dieser Befunde können Untersuchungen von PRISTOUPIL und Mitarbeitern (159) angesehen werden. Sie untersuchten die spezifische Drehung, die reduzierte Viskosität und den Präzipitationstiter von Rinderseum

in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer und fanden ganz ähnlich verlaufende Kurven mit den beschriebenen charakteristischen Maxima und Minima.

Tab. 1: Adsorption von Proteinen an Oberflächensystemen in Abhängigkeit von verschieden langer Hitzeeinwirkung.

Zeit der Hitzedenatu- rierung bei	Adsorption von Albumin in % an					
	Erythrocyten		Aktiv-Kohle		Polyaminostyrol	
	70°	75°	70°	75°	70°	75°
0 min	0,032	0,023	27,27	24,53	6,39	6,92 %
0,5	0,024	0,029	27,63	27,34	7,47	7,19
1	0,027	0,046	27,74	23,51	7,64	7,59
3	0,022	0,049	27,68	23,35	7,43	7,94
5	0,029	0,036	27,65	30,68	7,53	7,94
10	0,026	0,067	50,01	32,71	8,04	8,67
20	0,023	0,101	25,07	43,70	7,36	11,38
40	0,092	0,066	31,23	42,37	8,65	10,35
	30°		80°		30°	
0 min	0,22		63,13		15,67	
0,5	0,15		64,15		14,61	
1	0,26		65,69		15,26	
2	0,28		72,73		17,11	
5	0,31		89,91		21,73	
10	0,86		100		27,28	
15	1,48		100		29,93	
20	2,27		100		47,02	

Tab.1 (Fortsetzung)

Adsorption von gamma-Globulin in % an							
	Erythro- cyten	Aktiv- Kohle	Polyamino- styrol		Erythro- cyten	Aktiv- Kohle	Polyamino- styrol
Zeit bei	60°	60°	60°	Zeit bei	65°	65°	65°
0 min	0,96	14,97	7,00	0 min	1,14	14,80	8,20 %
2	1,20	17,77	8,52	1	1,13	14,93	7,35
5	1,13	18,58	8,30	2	1,02	14,58	7,52
10	1,23	19,82	8,45	5	1,07	14,88	7,65
20	1,11	19,94	9,37	10	1,04	15,66	8,54
30	1,10	20,39	9,18	20	1,01	16,16	8,24
60	1,00	20,37	9,16				
90	1,04	21,16	9,46				

Adsorption von Streptolysin O in % an							
	Erythrocyten		Aktiv-Kohle				Polyaminostyrol
Zeit bei	60°		60°				60°
0 min	0,36		100				29,72 %
0,5	0,36		91,10				28,12
1	0,52		92,03				28,33
3	0,49		97,61				33,36
5	0,41		94,69				35,76
10	0,65		92,67				35,30
20	0,64		96,01				34,76
40	0,39		98,10				35,86
Zeit bei	70°		70°				70°
0 min	0,31		92,47				33,32 %
0,5	0,37		91,06				29,65
1	0,35		89,41				30,76
3	0,36		92,13				32,73
5	0,38		91,39				36,46
10	0,41		90,62				36,96
20	0,51		87,71				39,79
40	0,47		86,06				42,84

Legende zu Abb. 1-7: Adsorption von Sroptolysin 0 in % der Gesamtmenge an Erythrocyten (Abb.7), an Aktiv-Kohle (Abb.8) und an Polyaminostyrol (Abb.9) in Abhängigkeit von der Hitzedenaturierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten.

C. Harnstoffdenaturierung

Die Ergebnisse der Adsorption von verschieden stark harnstoffdenaturiertem Human-Albumin und Human-gamma-Globulin an Erythrocyten, Kohle und Polyaminostyrol zeigen Tab.2 und die Abb.10 - 15. Wie sich aus den Kurven ergibt, steigt die Adsorption der stärker denaturierten Proben mit einer Ausnahme etwa ab 4 m Harnstoffkonzentration an. Geringere Harnstoffkonzentrationen beeinträchtigen die Adsorption der Proteine nicht in erkennbarem Ausmaß, obwohl auch hier mit anderen Methoden bereits Denaturierungseffekte festgestellt werden konnten. Bei Albumin erfolgt bei höchsten Harnstoffkonzentrationen keine Adsorptionsänderung gegenüber dem unbehandelten Protein, wenn Erythrocyten angeboten werden. Die Anlagerung an Kohle und Polyaminostyrol ist gegensinnig. Die Adsorption von gamma-Globulin wird in allen untersuchten Fällen bei hohen Harnstoffkonzentrationen größer. Eine stufenförmige Adsorption der Proteine, wie das bei der Hitzedenaturierung beobachtet wurde, ließ sich bei der Harnstoffdenaturierung dagegen nicht feststellen.

Tab.2: Adsorption von Proteinen an Oberflächensystemen in Abhängigkeit von der Einwirkung verschieden konzentrierter Harnstofflösungen.

Denaturierung durch	Adsorption von Albumin in % an		
Harnstoff	Erythrocyten	Aktiv-Kohle	Polyaminostyrol
10 molar	0,043	91,44	32,98 %
5	0,055	83,90	29,53
2,5	0,045	95,15	27,70
1,25	0,049	96,74	26,86
0,625	0,048	95,67	27,81
0,312	0,053	97,37	25,86
0,156	0,041	93,10	24,52
0,078	0,046	95,67	25,31

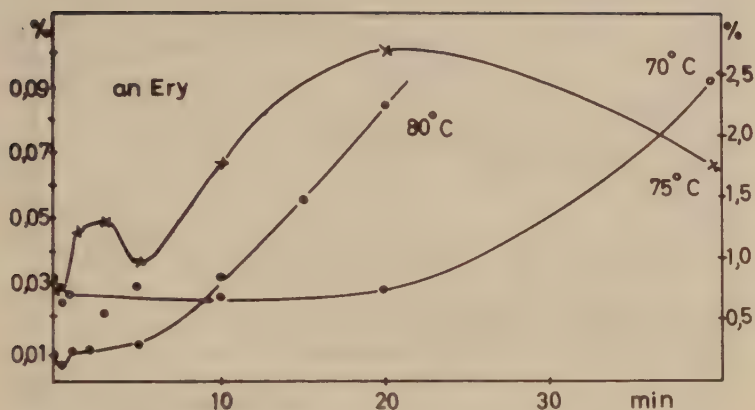


Abb. 1. Adsorption von Albumin in % der Gesamtmenge an Erythrocyten in Abhängigkeit von der Hitzedenaturierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten.

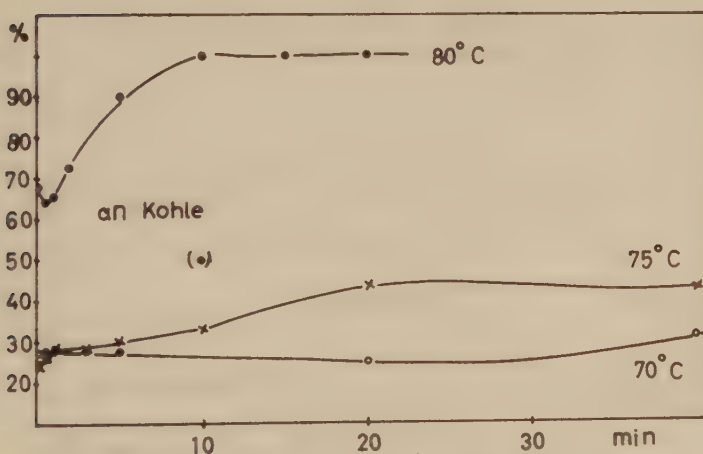


Abb. 2. Adsorption von Albumin in % der Gesamtmenge an Aktivkohle in Abhängigkeit von der Hitzedenaturierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten.

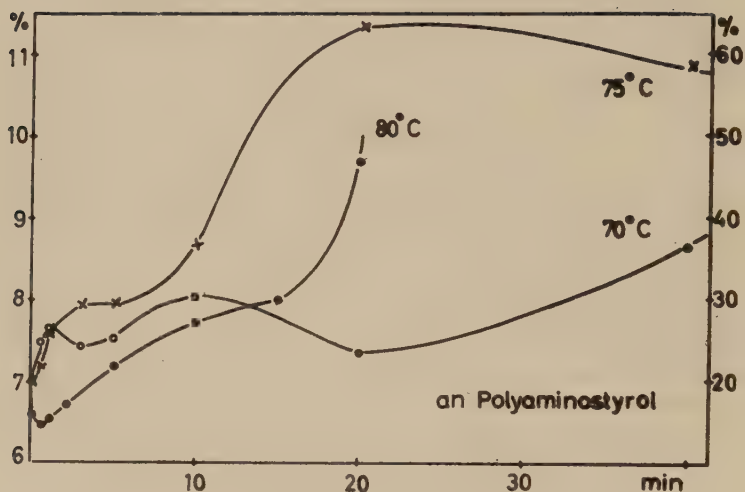


Abb. 3. Adsorption von Albumin in % der Gesamtmenge an Polyaminostyrol in Abhängigkeit von der Hitzedenaturierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten.

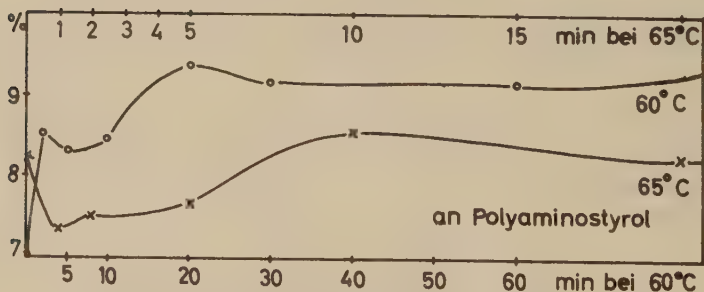


Abb. 4. Adsorption von gamma-Globulin in % der Gesamtmenge an Polyaminostyrol in Abhängigkeit von der Hitzedenaturierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten.

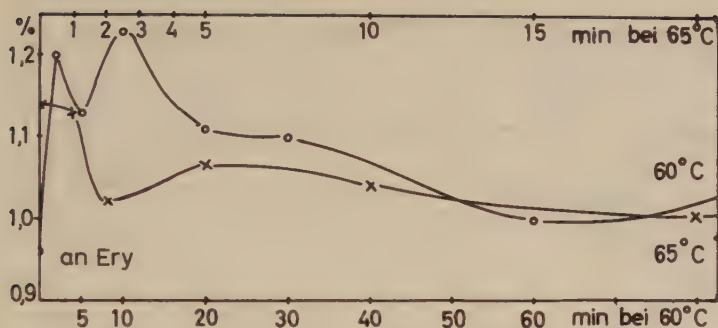


Abb. 5. Adsorption von gamma-Globulin in % der Gesamtmenge an Erythrocyten in Abhängigkeit von der Hitzedenaturierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten.

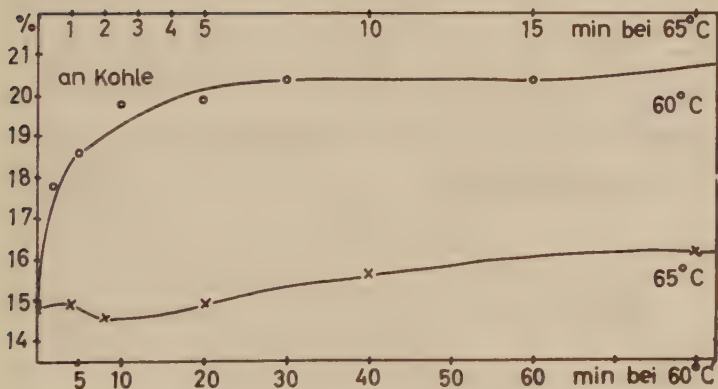


Abb. 6. Adsorption von gamma-Globulin in % der Gesamtmenge an Kohle in Abhängigkeit von der Hitzedenaturierung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten.

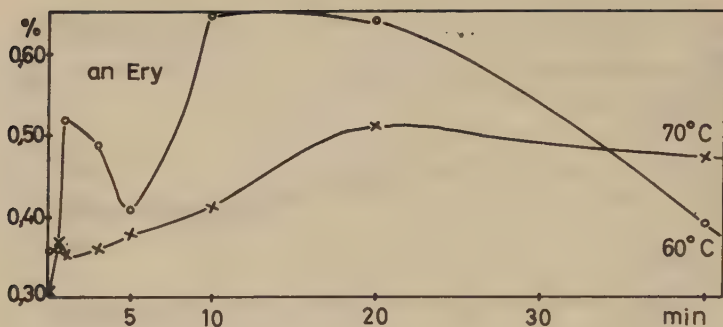


Abb. 7.

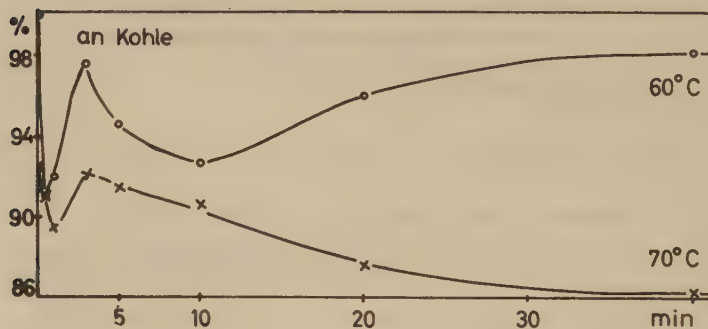


Abb. 8.

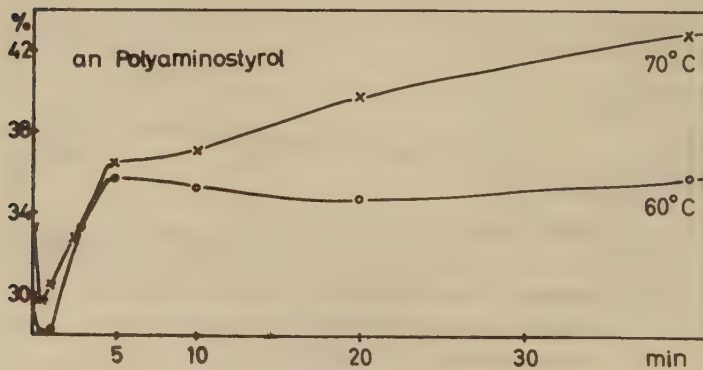


Abb. 9.

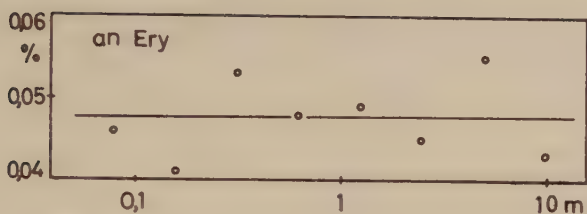


Abb. 10.

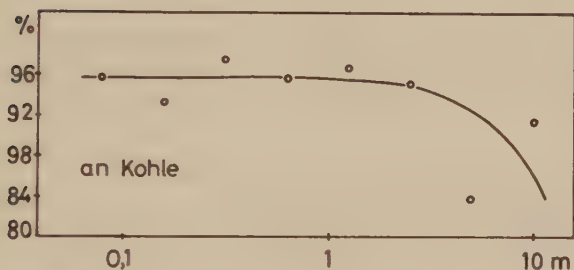


Abb. 11.

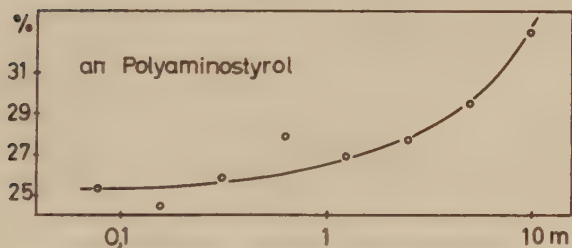


Abb. 12. Adsorption von Human-Albumin in % der Gesamtmenge des Proteins an Erythrocyten (Abb. 10), an Aktiv-Kohle (Abb. 11) und an Polyaminostyrol in Abhängigkeit von der Einwirkung verschieden konzentrierter Harnstofflösungen.

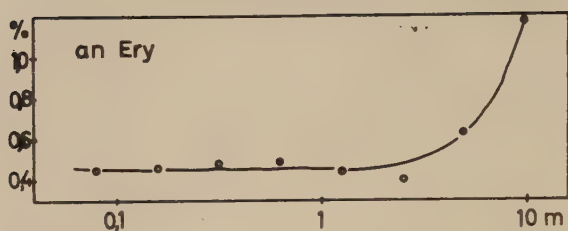


Abb. 13.

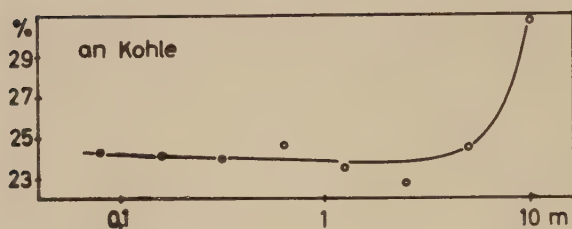


Abb. 14.

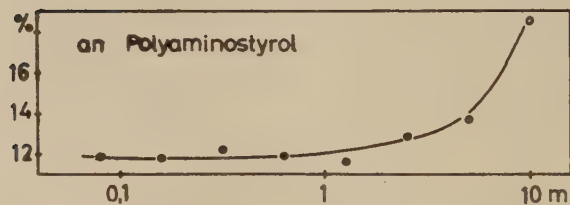


Abb. 15. Adsorption von Human-gamma-Globulin in % der Gesamtmenge des Proteins an Erythrocyten (Abb. 13), an Aktiv-Kohle (Abb. 14) und an Polyaminostyrol (Abb. 15) in Abhängigkeit von der Einwirkung verschieden konzentrierter Harnstofflösungen.

Tab.2 (Fortsetzung):

Denaturierung durch Harnstoff	Adsorption von gamma-Globulin in % an			
	Erythrocyten	Aktiv-Kohle	Polyaminostyrol	
10 molar	1,18	30,77	18,45	%
5	0,63	24,53	13,65	
2,5	0,40	22,80	12,86	
1,25	0,44	23,54	11,63	
0,625	0,49	24,70	11,90	
0,312	0,48	23,97	12,18	
0,156	0,46	24,16	11,82	
0,078	0,45	24,33	11,90	

D. Denaturierung mit Ammonpersulfat

Die Adsorptionskurven der mit Ammonpersulfat stark oxydierend denaturierten Proteine Human-Albumin und Human-gamma-Globulin sind aus den Abb.16 - 21 und Tab.3 zu ersehen. Auch hier zeigt sich ein Ansteigen der Adsorption bei den stärker denaturierten Proteinchargen. Wie aus dem Adsorptionsverhalten zu schließen ist, erfolgt die Denaturierung in einem Konzentrationsbereich am Ammonsulfat zwischen 0,5 und 0,01 n; in Ammonpersulfat-Konzentrationen von weniger als 0,01 n wirkt sich die Denaturierung zumindest nicht mehr auf das Adsorptionsverhalten aus. Entsprechend wie bei der Harnstoffdenaturierung sieht man auch hier kein stufenförmiges Ansteigen der Adsorption mit wachsender Denaturierung bei höheren Ammonpersulfatkonzentrationen.

Tab. 3: Adsorption von Proteinen an Oberflächensystemen in Abhängigkeit von der Einwirkung verschieden konzentrierter Ammonpersulfatlösungen.

Denaturierung durch Ammonpersulfat	Adsorption von Albumin in % an			
	Erythrocyten	Aktiv-Kohle	Polyaminostyrol	
0,5 n $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,126	99,60	52,65	%
0,25	0,090	99,82	51,87	
0,125	0,069	99,76	54,25	
0,062	0,067	97,65	36,56	
0,031	0,048	96,69	29,05	
0,016	0,063	97,56	27,02	
0,008	0,051	97,61	27,38	
0,004	0,053	97,19	28,62	

Denaturierung durch Ammonpersulfat	Adsorption von gamma-Globulin in % an			
	Erythrocyten	Aktiv-Kohle	Polyaminostyrol	
0,4 n $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	3,66	39,70	44,09	%
0,2	3,43	49,61	38,13	
0,1	1,85	52,12	30,26	
0,05	0,76	34,45	16,34	
0,025	0,69	22,36	12,92	
0,012	0,60	21,04	10,22	
0,006	0,52	20,30	9,36	
0,003	0,50	19,06	9,64	

Legende zu Abb. 16 - 18: Adsorption von Human-Albumin in % der Gesamtmenge des Proteins an Erythrocyten (Abb. 16), an Aktiv-Kohle (Abb. 17) und an Polyaminostyrol (Abb. 18) in Abhängigkeit von der Einwirkung verschieden konzentrierter Ammonpersulfatlösungen.

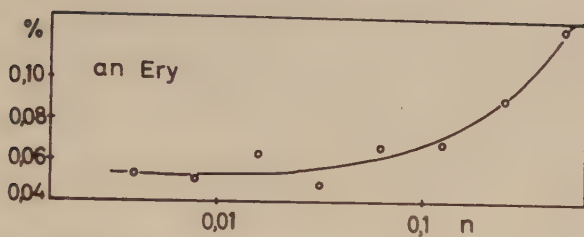


Abb. 16.

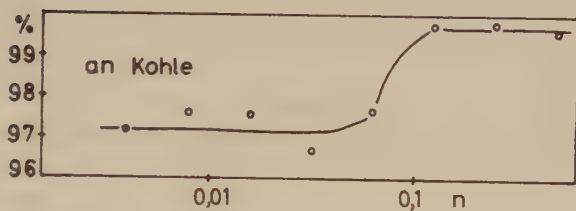


Abb. 17.

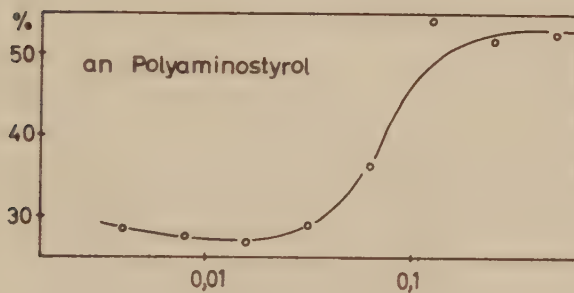


Abb. 18.

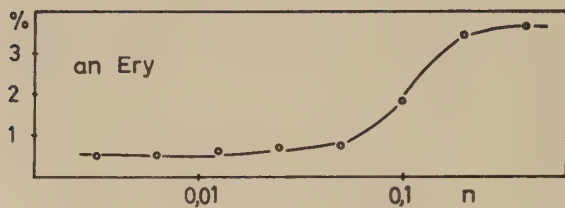


Abb. 19.

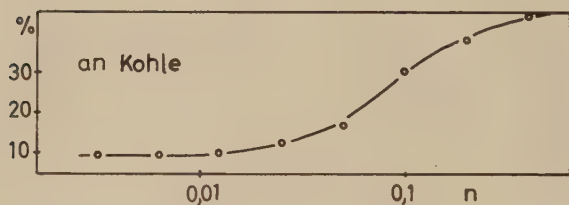


Abb. 20.

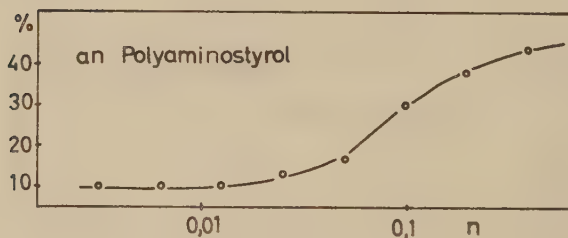


Abb. 21. Adsorption von gamma-Globulin in % der Gesamtmenge des Proteins an Erythrocyten (Abb. 19), an Aktiv-Kohle (Abb. 20) und an Polyaminostyrol (Abb. 21) in Abhängigkeit von der Einwirkung verschieden konzentrierter Ammonpersulfat-Lösungen.

E. Diskussion

Ein Vergleich der nach verschiedenen Methoden und bei verschiedenen Proteinen durchgeführten Denaturierungen an verschiedenen Oberflächensystemen läßt aus obigen Untersuchungen folgende Schlüsse zu: Die Adsorption von Proteinen an beliebige Oberflächensysteme ist eine empfindliche Nachweisreaktion für ihre Denaturierung; besonders auf Hitzedenaturierung spricht das Adsorptionsverhalten der Eiweißkörper sehr sensibel an.

In den meisten Fällen steigt die Adsorption bei stärkerer Proteindenaturierung an, aber auch ein Absinken der Adsorptionsraten wurde in einigen Fällen beobachtet. Daraus kann man folgern, daß die Adsorption sowohl hinsichtlich der Oberflächensysteme wie auch der Proteine und ihres jeweiligen Denaturierungsgrades ein spezifischer Prozeß ist, der sich nicht nach allgemeinen Regeln richtet. Diese Spezifität kann ihrerseits als gute Stütze für die Hypothese betrachtet werden, daß der physiologischen Eliminierung der Plasmaproteine aus der Blutbahn als erster Schritt eine spezifische Adsorption der entsprechenden Proteine an die Membranen von Zellen vorangeht. Daran mögen sich dann weitere Reaktionen des Eiweißstoffwechsels anschließen.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Material

^{131}J -markiertes Human-Albumin wurde vom Radiochemical Centre, Amersham, bezogen und bei 4°C jeweils 24 Stunden vor Verwendung gegen etwa 10 l physiologische NaCl-Lösung dialysiert.

Die Markierung von Human-gamma-Globulin (Behring-Werke Marburg) erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von PRESSMAN und STERNBERGER (158): Eine Na^{131}J -Lösung (10 ml, Radiochemical Centre, Amersham) wurde mit ca. 2 ml 0,1 n HCl-Lösung angesäuert und eine HJO_3 -Lösung bis zum Auftreten von elementarem Jod zugegeben. Der Nachweis des freien Jods geschah durch Stärkepapier. Danach wurde die saure Lösung mit 0,1 n NaOH-Lösung auf pH 8,0 gebracht und dieses Reaktionsgemisch 30 min auf Human-gamma-Globulin einwirken lassen, das mit 0,4 m SÖRENSEN-Phosphatpuffer pH 8,0 im Verhältnis 1 : 1 versetzt war. Die Jodierungsreaktion wurde nach dieser Zeit durch Zusatz von 0,5 ml 1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung abgestoppt.

Streptolysin 0 (400 Einheiten, Behringwerke, Marburg) löste man in 5 ml 0,2 m SÖRENSEN-Phosphatpuffer pH 3,0 auf. Die Markierung erfolgte in analoger Weise wie beim Human-gamma-Globulin.

Die Lösungen dialysierten nach der Jodierungsreaktion während 48 Stunden in insgesamt 30 l physiologischer NaCl-Lösung. Die so hergestellten ^{131}I -markierten Proteine in physiologischer Kochsalzlösung wurden konventionell auf eine Standardkonzentration von etwa 0,2 g% eingestellt und so verschiedenen Denaturierungsmethoden ausgesetzt.

B. Denaturierung durch Hitze, Harnstoff und Ammonpersulfat

Bei der Hitzedenaturierung wurden die Proteinlösungen in Reagenzgläsern (Ø 12 mm) verschieden lang in ein Wasserbad der entsprechenden Temperatur eingebracht und die nach der Hitzeeinwirkung unlöslich gewordenen Proteinanteile durch Zentrifugieren und Filtrieren durch ein Papierfilter entfernt.

Zur Denaturierung mit Harnstoff und Ammonpersulfat wurden die Proteinlösungen in der jeweiligen Salzkonzentration 24 Stunden bei 4°C stehen gelassen. Nach anschließender Dialyse gegen 10 l physiolog. NaCl-Lösung während 24 Stunden bei 4°C zur Entfernung der Denaturierungsreagenzien wurden, ebenso wie bei den hitzedenaturierten Proteinen, die unlöslich gewordenen Proteinbestandteile durch Zentrifugieren und Filtrieren entfernt. In allen Fällen, in denen Eiweiß in merklicher Menge durch Unlöslichkeit verloren ging, wurden die Konzentrationen konventionell für jede Versuchsreihe neu konstant eingestellt, um mögliche Fehler auszuschalten, die durch verschiedene Proteinkonzentrationen zustande kommen könnten.

C. Adsorption

Die Adsorption geschah an Human-Erythrocyten, Kohle und vernetztes Polyaminostyrol.

Menschliches Blut wurde mit physiologischer Kochsalzlösung proteinfrei gewaschen, etwa auf $5 \cdot 10^6$ Erythrocyten pro 1 mm³ eingestellt und davon je Ansatz konventionell 0,5 - 1 ml vorgegeben.

Von Aktiv-Kohle und vernetztem Polyaminostyrol (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) kamen je 20 mg zur Einwaage. Jeder Ansatz wurde auf 5 ml Gesamtvolumen mit physiologischer NaCl-Lösung gebracht, der Proteinanteil betrug dabei etwa 0,02 - 0,05 g%, die Aktivitäten variierten zwischen $5 \cdot 10^4$

bis $2 \cdot 10^6$ Imp./min. Die Inkubationszeit lag bei Raumtemperatur bei 30 min. Danach wurde dreimal mit je 5 ml physiolog. NaCl-Lösung gewaschen und die Aktivität des Proteins gemessen, das adsorptiv gebunden war. Die Aktivitätsmessungen erfolgten in einem Szintillationszähler mit Bohrlochkristall der Fa. Frieske und Hoepfner, Erlangen. Die prozentuale Ausbeute des adsorbierten Proteins errechnet sich daraus in Relation zu der insgesamt angebotenen Aktivität bzw. der entsprechenden Proteinmenge.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Human-Albumin, Human-gamma-Globulin und Streptolysin 0 wurden nach drei Methoden (durch Hitze, Harnstoff und Ammonpersulfat) denaturiert und die Adsorption an verschiedene Oberflächensysteme (Human-Erythrocyten, Aktiv-Kohle und vernetzte Polyaminostyrol-Partikel) in Abhängigkeit von ihrer Denaturierung untersucht.

Dabei ergab sich folgendes Resultat: Im allgemeinen steigt zwar die Adsorption von Proteinen an beliebige Oberflächen mit wachsender Denaturierung an, aber das gilt nicht unter allen Umständen. Es wurde auch der umgekehrte Effekt beobachtet. Die Adsorption von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Denaturierung scheint ein sehr spezifischer Vorgang zu sein, der wesentlich von drei Faktoren: a) Art des Proteins, b) Denaturierungsmodus, c) Art der Oberfläche, beeinflusst wird.

Die Untersuchungen wurden als Modellreaktion für das Verhalten von Proteinen und Paraproteinen im physiologischen Eiweißmetabolismus durchgeführt.

LITERATUR

1. A. Allela, Protective action of sodium caprylate in denaturation of proteins, *Boll.soc.ital.biol.sper.* 27, 33 (1951), zit. nach *Chem.Abstr.* 46, 545a (1952)
2. N.G.Anderson, T.Makinodan, C.B.Norris, Isolated cell components. XIII. The effect of heat on rat liver soluble proteins, *Exptl.Cell Research* 22, 526 (1961), zit. nach *Chem.Abstr.* 56, 2694a (1962)
3. M.L.Anson, The denaturation of proteins by detergents and bile salts, *Science (Wash.)* 90, 256 (1939)
4. S.Araya, M.Kobayashi, Protein denaturation and biuret reaction, *J.Biochem.(Tokyo)* 33, 7 (1951), zit. nach *Chem.Abstr.* 45, 7178b (1951)
5. M.F.Argus, C.J.Leutze, J.F.Kane, Nitrosamine und andere Carcinogene als Agentien der Protein-Denaturierung. *Experientia (Basel)* 17, 357 (1961)
6. W.T.Astbury, R.Lomax, An X-ray study of the hydration and denaturation of proteins, *J.chem.Soc. (London)* 1935, 346
7. A.H.W.Aten jr., C.J.Dippel, K.J.Keuning, J.van Dreven, Denaturation and optical rotation of proteins, *J.Colloid Sci.* 3, 65 (1943)
8. L.G.Augenstine, B.R.Ray, Trypsin monolayers at the air-water interface. II. Effect of X-ray and ultraviolet radiation upon enzymatic activity. *J.Phys.Chem.* 61, 1380 (1957)
9. S.Basu, S.P.Nandi, Protein denaturation and pepsin inactivation, *Enzymologia* 14, 397 (1951), zit. nach *Chem.Abstr.* 47, 3359e (1953)
10. F.C.Bawden, N.W.Pirie, The effects of alkali and some simple organic substances on three plant viruses, *Biochem.J.* 34, 1278 (1940)
11. F.C.Bawden, N.W.Pirie, The inactivation of tomato bushy stunt virus by heating and freezing, *Biochem.J.* 37, 70 (1943)
12. V.A.Belicer, Protein denaturation, *Congr.intern.biochim., Résumés communs*, 3^e Congr. Brussels 1955, 19, zit. nach *Chem.Abstr.* 50, 12146h (1956)
13. V.A.Belitser, E.L.Khodorova, Denaturation and dissolution of proteins in alcohol-water mixtures, *Ukrain.Biokhim.Zhur.* 21, 34 (1949), zit. nach *Chem.Abstr.* 48, 4605g (1954)
14. V.A.Belitser, A.S.Tsiperovich, The mechanism of protein denaturation. II. The predenaturative changes of the protein molecule, *Ukrain.Biokhim.Zhur.* 20, 322 (1948), zit. nach *Chem.Abstr.* 48, 5895f (1954)

15. V.A.Belitser, A.S.Tsyperovich, Stepwise denaturation changes in protein molecule, Doklady Akad.Nauk. S.S.S.R. 83, 257 (1952), zit. nach Chem.Abstr.46, 8685g (1952)
16. J.Bello, H.R.Bello, Evidence from model peptides relating to the denaturation of proteins by Lithium salts, Nature 194, 681 (1962)
17. G.Benetato, V.Nestianu, V.Benetato, O.Maior, Reversible denaturation of nerve proteins and its relation to the functional capacity of nerves, Studii Cercetari Fiziol. 6, 177 (1961), zit. nach Chem.Abstr. 56, 3935i (1962)
18. I.Blei, B.Carroll, The characterizaion of denaturated proteins by adsorption indicators, J.Colloid Sci. 15, 209 (1960)
19. S.G.Blohm, The relation between the skin-irritating and the protein-denaturing effects of some surface-active substances, Acta Dermato-Venereol. 37, 269 (1957), zit. nach Chem.Abstr. 54, 18783d (1960)
20. G.A.Boyd, Ultra-high frequency denaturation of proteins, J.Chem.Phys. 14, 351 (1946)
21. D.R.Briggs, R.Hull, Studies on protein denaturation. I. Electrophoretic study kinetics at neutrality of heat denaturation of β -lactoglobulin, J.Amer.Chem.Soc. 67, 2007 (1945)
22. N.Bulankin, E.M.Mamotyuk, Polarographic studies of the process of denaturation, Ukrain.Biokhim.Zhur. 26, 146 (1954), zit. nach Chem. Abstr. 49, 1117i (1955)
23. I.N.Bulankin, A.S.Nikonova, R.F.Rokhkind, L.Ya.Popova, E.V.Ushkats, Combined urea and acid-alkaline denaturation of globular proteins, Ukrain.Biokhim.Zhur. 24, 216 (1952), zit. nach Chem.Abstr. 48, 11511b (1954)
24. I.N.Bulankin, N.A.Shabanova, The order of the reaction in acid-alkaline protein denaturation, Ukrain.Biokhim.Zhur. 26, 235 (1954), zit. nach Chem.Abstr. 49, 9705g (1955)
25. H.B.Bull, Protein denaturation, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 6, 140 (1938), zit. nach Chem.Abstr. 36, 3198⁶ (1942)
26. H.B.Bull, H.Neurath, The denaturation and hydration of proteins. II. Surface denaturation of egg albumin, J.Biol.Chem.118, 163 (1937)
27. Ch'eng-Fa Wang, Hsien Wu, Studies on denaturation of proteins. XVI. Further observations on coagulation and denaturation of egg albumin by shaking, Chinese J.Physiol.15, 67 (1940), zit. nach Chem. Abstr. 34, 4755 (1940)

28. M.P. Chernikov, Effect of denaturation and post-denaturation aggregation on the rates of enzymic hydrolysis of proteins. *Voprosy Med. Khim.* 3, 115 (1957), zit. nach Chem. Abstr. 53, 7253 f (1959)
29. R.S. Chernyak, A.G. Pasynskii, Change of shape of protein molecules during denaturation by organic substances, *Kolloid. Zhur.* 14, 204 (1952), zit. nach Chem. Abstr. 46, 8469 b (1952)
30. J.H. Clark, The denaturation of proteins by chromium salts, *A.M.A. Arch. Ind. Health* 20, 117 (1959), zit. nach Chem. Abstr. 54, 1641 c (1960)
31. H.R. Cohen, The effect of dry grinding on the properties of proteins. I. Native, denatured and coagulated ovalbumin, *Arch. Biochem.* 2, 1 (1943)
32. G. Colacicco, Urea cation in the mechanism of denaturation of proteins, *Nature* 198, 583 (1963)
33. D. Coleman, F.O. Howitt, Denaturation and renaturation of proteins, *Nature* 155, 78 (1945)
34. J.R. Colvin, Thermal denaturation of proteins as an order-disorder transition in a high polymer, *Arch. Biochem.* 46, 385 (1953)
35. J.R. Colvin, Binding of anions by denaturated proteins, *Canad. J. Chem.* 30, 973 (1952), zit. nach Chem. Abstr. 47, 6460 g (1953)
36. A.A. Darialashvili, The state of functional groups of fatigued myocardial tissue protein, *Trudy Inst. Klin. i Eksptl. Kardiol.*, *Akad. Nauk. Gruzin S.S.R.* 5, 527 (1958), zit. nach Chem. Abstr. 55, 6653 b (1961)
37. G. Dechev, Heat denaturation of proteins, *Bulgar. Akad. Nauk.* 11, 67 (1961), zit. nach Chem. Abstr. 55, 22406 i (1961)
38. H.G. Dervichian, Interprétation de la dénaturation et des propriétés physicochimiques des protéines. *Compt. rend.* 212, 86 (1941)
39. R.S. Desowitz, Denaturing effect of basic trypanocidal drugs on the protein of cell-free trypanosomal extracts, *Exptl. Parasitol.* 9, 233 (1960), zit. nach Chem. Abstr. 56, 13492 a (1962)
40. V. Desreux, C. Fabry, Denaturation of proteins by detergents, *Bull. soc. chim. biol.* 28, 478 (1946), zit. nach Chem. Abstr. 41, 4521a (1947)
41. F. Di Jeso, Determination of the iodoacetate bound to plasma fractions during denaturation, *Rev. espan. fisiol.* 16 Suppl. 3, 37 (1960), zit. nach Chem. Abstr. 55, 4601 h (1961)
42. P. Doty, J.T. Edsall, Light scattering in protein solutions, *Advances in Protein Chemistry* 6, 35 New York 1951

44. E.L.Duggan, J.M.Luck, The combination of organic anions with serum albumin, *J.Biol.Chem.* 172, 205 (1948)
45. G.H.Echols jr., Dissertation: X-ray scattering study of protein denaturation, *zit. nach Chem.Abstr.* 54, 5763 d (1960)
46. J.T.Edsall, J.W.Mehl, The effect of denaturing agents on myosin. II. Viscosity and double refraction of flow, *J.Biol.Chem.* 133, 409 (1940)
47. A.Elliott, E.J.Ambrose, C.Robinson, Chain configurations in natured an denatured insulin: Evidence from infra-red spectra, *Nature* 166, 194 (1950)
48. J.Engel, Untersuchung des Mechanismus der Denaturierung und Renaturierung von löslichem Kollagen mit der Lichtstreuungsmethode, *Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.* 325, 287 (1961)
49. H.Engelhard, Grundvorgänge der Strahlenwirkung in biologischen Systemen, *Strahlentherapie* 111, 371 (1960)
50. J.Enselme, J.Tigaud, Controlles denaturation of plasma proteins. I-III. *Bull.soc.chim.biol.* 36, 815, 821, 1087 (1954), *zit. nach Chem.Abstr.* 49, 1832 efg (1955)
51. J.Enselme, J.Tigaud, Further studies on formol-treated proteins, *Bull.soc.chim.biol.* 39, 1249 (1957), *zit.nach Chem.Abstr.* 53, 9304 f (1959)
52. J.O.Erickson, H.Neurath, The serological activity of denatured antibodies, *Science (Wash.)* 98, 284 (1943)
53. N.F.Ermolenko, D.Z.Ginzburg, Denaturation of vegetable proteins by urea, *Izvest.Akad.Nauk.Belorus. S.S.R.* 1953, 101, *zit. nach Chem.Abstr.* 50, 14069 c (1956)
54. S.Fiala, Über die Oxydations- und Reduktionswirkung der UV-Strahlen auf Eiweißkörper, *Biochem.Z.* 318, 67 (1947)
55. O.Folin, V.Ciocalteu, Über Tyrosin- und Tryptophanbestimmungen in Proteinen, *J.Biol.Chem.* 73, 627 (1927), *zit. nach Chem.Zentralblatt* 1927, 2089
56. J.F.Foster, E.G.Samsa, G.F.Hanna, Streaming orientation studies on denatured proteins, V, Bovine Serum albumin, *J.Amer.Chem.Soc.* 76, 6044 (1954)
57. H.Fricke, The denaturation of proteins by high-frequency radiations, *Cold Spring Harbor Symposia Quant.Biol.* 6, 164 (1938), *zit. nach Chem.Abstr.* 36, 3199 (1942)
58. H.Fricke, Effect of ionizing radiation on protein denaturation, *Nature* 169, 965 (1952)

59. M. Funatsu, G. Funatsu, Denaturation of proteins by sodium-p-aminosalicylate. II-IV. Nippon Kogei-kagaku Kaishi 30, 293, 298, 304 (1956), zit. nach Chem. Abstr. 51, 18034 hi (1957)
60. M. Funatsu, G. Funatsu, T. Inutsuka, Denaturation of proteins by sodium-p-aminosalicylate. I. J. Agr. Chem. Soc. Japan 30, 252 (1956), zit. nach Chem. Abstr. 51, 1336 g (1957)
61. A. W. Galston, R. Kaur, Interactions of pectin and protein in the heat coagulation of proteins, Science (Wash.) 138, 903 (1962)
62. R. J. Gibbs, M. Bier, F. F. Nord, Investigations on proteins and polymers. VII. The denaturation of egg albumin, Arch. Biochem. 35, 216 (1952)
63. R. J. Gibbs, Investigations on proteins and polymers. VIII. Remarks on the denaturation of proteins, Arch. Biochem. 35, 229 (1952)
64. R. J. Gibbs, S. N. Timasheff, F. F. Nord, Investigations on proteins and polymers. IX. Denaturation studies of egg albumin with aliphatic amines, Arch. Biochem. 40, 85 (1952)
65. A. N. Glazer, E. L. Smith, Effect of denaturation on the ultraviolet absorption spectra of proteins. J. Biol. Chem. 235, PC 43 (1960)
66. L. B. Gorbacheva, S. E. Bresler, S. Ya. Frenkel, The morphological changes of proteins and denaturation phenomena, Biokhimiya 22, 70 (1957), zit. nach Chem. Abstr. 51, 11417 e (1957)
67. H. Gordon, Über die Wirkung denaturierender Agenzien auf die Farbstoffdurchlässigkeit überlebender Zellen, Arch. exptl. Zellforsch. 25, 51 (1943), zit. nach Chem. Zentralblatt 1944, I, 97
68. J. A. Gordon, W. P. Jencks, The relation of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins, Biochemistry 2, 47 (1963)
69. P. Grabar, M. Kaminski, Denaturation of proteins. II. Modifications of ovalbumin produced by various chemical or physical agents and studied by an immuno-chemical method, Bull. soc. chim. biol. 32, 620 (1950), zit. nach Chem. Abstr. 45, 3432 h (1951)
70. F. Gramlich, D. Mohring, H. E. Müller, Quantitative Untersuchungen zur Beladbarkeit normaler und vorbehandelter Kaninchenerythrocyten mit Human-Albumin-J-131 und -gamma-Globulin-J-131, Z. Hygiene 149, 187 (1963)
71. F. Gramlich, H. E. Müller, Weitere Untersuchungen zum Serumproteinfilm an der Oberfläche normaler, menschlicher Erythrocyten, Acta haematol. 30, 236 (1963)
72. F. Gramlich, H. E. Müller, unveröffentlichte Versuche.
73. E. A. Grant, R. B. Dow, W. R. Franks, Denaturation of egg albumin by pressure, Science (Wash.) 94, 616 (1941)

74. J.P.Greenstein, J.T.Edsall, The effect of denaturing agents on myosin. I. Sulfhydryl groups as estimated by porphyridin titration, *J.Biol.Chem.* 133, 397 (1940)
75. I.K.Gul'mirzaeva, Effect of penetrating radiation on proteins of anti-diphtheria serum, *Akad.Nauk.Uz. S.S.R.* 3, 361 (1961), zit. nach *Chem.Abstr.* 57, 12832i (1962)
76. K.H.Gustavson, Untersuchungen über das Wesen der Eiweißdenaturierung durch Prüfung der Reaktionsfähigkeit einiger nativer und hitzedenaturierter Proteine, *Biochem.Z.* 311, 347 (1942)
77. K.Hamaguchi, Protein denaturation by a surface chemical method. I. The relations between monolayer properties and urea denaturation of lysozyme, *J.Biochem. (Tokyo)* 42, 449 (1955)
78. K.Hamaguchi, Protein denaturation by a surface chemical method. II. The mechanism of surface denaturation of lysozyme, *J.Biochem. (Tokyo)* 42, 705 (1955), zit. nach *Chem.Abstr.* 50, 6524d (1956)
79. K.Hamaguchi, Protein denaturation by a surface chemical method. III. The interaction of urea with lysozyme monolayer, *J.Biochem. (Tokyo)* 43, 83 (1956), zit. nach *Chem.Abstr.* 50, 10140f (1956)
80. K.Hamaguchi, Protein denaturation by a surface chemical method. IV. The structure of lysozyme monolayer, *J.Biochem. (Tokyo)* 43, 355 (1956), zit. nach *Chem.Abstr.* 50, 14813a (1956)
81. G.F.Hanna, J.F.Foster, Streaming orientation studies on denatured proteins. IV. Denaturation of ovalbumin with surface active ions, *J.Phys.Chem.* 57, 614 (1953)
82. F.Haurowitz, Eiweißdenaturierung, Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Herausgeber: K.Lang, E.Lehnartz, Bd.VI, 1, S.116-125
83. K.Hayashi, Cell-stimulating actions of high hydrostatic pressure, *Nippon Seirigaku Zasshi* 23, 527 (1961), zit. nach *Chem.Abstr.* 56, 13376a (1962)
84. B.M.Hendrix, J.Dennis, *J.Biol.Chem.* 126, 315 (1938), Changes of nitrogen content brought about by denaturation of proteins.
85. K.Higashi, M.Takeda, H.Sassa, Denaturation of protein by ultra-short-waves, *Science (Japan)* 18, 467 (1948), zit. nach *Chem.Abstr.* 45, 5736a (1951)
86. N.C.Hughes-Jones, B.Gardner, The exchange of ¹³¹I-labelled lipid and ¹³¹I-labelled protein between red cells and serum, *Biochem.J.* 83, 404 (1962)

87. K.Hummel, Energetische Betrachtungen zur Antigen-Antikörper-Bindung, Z.Immunitätsf. 122, 179 (1962)
88. K.Imahori, The structure of surface denatured protein. VII. The activity and the shape of the surface denatured pepsin molecule, Bull.Chem.Soc. Japan 29, 172 (1956), zit. nach Chem.Abstr. 51, 2089 f (1957)
89. R.Jaenicke, J.Stauff, Aggregation eines disulfid- und sulfhydrylgruppen-freien Proteins, Kolloid-Z. 178, 143 (1961)
90. E.V.Jensen, Sulfhydryl-disulfide interchange, Science (Wash.) 130, 1319 (1959)
91. B.Jirgensons, Changes of viscosity associated with denaturation of some spheroproteins, Makromolekulare Chem. 2, 201 (1948)
92. B.Jirgensons, Denaturation of plant proteins. I. J.Polymer Sci. 3, 635 (1948)
93. B.Jirgensons, Denaturation of plant proteins. III. Optical rotation, viscosity and reducing capacity of denatured proteins, J.Polymer Sci. 5, 179 (1950)
94. B.Jirgensons, Optical rotation and viscosity of native and denatured proteins. X. Further studies on optical rotatory dispersion. XI. Relationship between rotatory dispersion, ionization and configuration. Arch. Biochem. 74, 57, 70 (1953)
95. B.Jirgensons, T.Ikenaka, Disulfide bridges and configuration of human serum albumin, Makromolekulare Chem. 31, 112 (1959)
96. F.H.Johnson, D.H.Campbell, Pressure and protein denaturation, J.Biol.Chem. 163, 689 (1946)
97. F.H.Johnson, D.Brown, D.Marsland, A basic mechanism in the biological effects of temperature, pressure and narcotics, Science (Wash.) 95, 200 (1942)
98. M.Joly, Energies d'interaction entre molécules de protéines dénaturées, J.chim.Phys. 56, 897 (1959)
99. K.Kanig, H.Künkel, Über die Denaturierung von Blutplasma-Proteinen durch Ultraschall in vitro. I - III. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 309, 162, 166, 171 (1958)
100. N.S.Kapany, N.A.Peppers, H.C.Zweng, M.Flocks, Retinal photocoagulation by lasers, Nature 199 (1963) 146
101. W.Kern, W.Herold, B.Scherhag, Polyvinylsulfonsäure als Katalysator hydrolytischer Reaktionen, Makromolekulare Chem. 17, 231 (1956)
102. W.Kern, B.Scherhag, Über die Hydrolyse von Peptiden und Proteinen mit Polyvinylsulfonsäure, Makromolekulare Chem. 28, 209 (1958)

103. D.Kertész, Denaturation of proteins by heat, *Bull.soc.chim.biol.* 35, 623 (1953), zit. nach *Chem.Abstr.* 48, 755e (1954)
104. M.Kitamikado, Alteration of yeast cell protein by denaturing agents, *J.Fac.Agr.Kyushu Univ.* 11, 155 (1955), zit. nach *Chem.Abstr.* 54, 8992d (1960)
105. N.Kleine, Über den Verlauf der Adsorptionsisotherme und der Desorption von Plasmaeiweiß bei gelagerten Erythrocyten, *Ber. 9.Tag dtsh. Ges.Bluttransfus. Braunschweig* 1960, 12, 105, Karger, Basel 1961.
106. A.Kleczkowski, The effect of salts on the formation of protein complexes during heat denaturation, *Biochem.J.* 37, 30 (1943)
107. J.M.Klotz, V.H.Stryker, "Denaturation" of a synthetic polymer and its relationship to protein denaturation, *J.Amer.Chem.Soc.* 82, 5169 (1960)
108. I.M.Kolthoff, A.Anastasi, B.H.Tan, Reactivity of sulfhydryl and disulfide in proteins. V. Reversal of denaturation of bovine serum albumin in 4 M guanidine hydrochloride or 8 M urea and of splitting of disulfide groups in 4 M GHCl, *J.Amer.Chem.Soc.* 82, 4147 (1960)
109. M.J.Kopac, The interfacial denaturation of proteins in the presence of aromatic diamidines and nucleic acids, *Cancer Research* 7, 714 (1947)
110. K.Kühn, Untersuchungen zur Renaturierung des Kollagenmoleküls, *Angew.Chem.* 75, 421 (1963)
111. W.Kuhn, H.Kuhn, Bedeutung beschränkt freier Drehbarkeit für die Viskosität und Strömungsdoppelbrechung von Fadenmolekülen, *Helv. Chem.Acta* 28, 1533 (1945)
112. T.Kuusi, The effect of urea denaturation on the inductor properties of a protein fraction of bone marrow, *Acta Embryol.Morphol.Exptl.* 4, 18 (1961), zit. nach *Chem.Abstr.* 58, 12915d (1963)
113. V.K.La Mer, The energy of activation of protein denaturations, *Science (Wash.)* 86, 614 (1937)
114. I.Langmuir, The constitution and fundamental properties of solids and liquids, *J.Amer.Chem.Soc.* 38, 2221 (1916)
115. I.Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J.Amer.Chem.Soc.* 40, 1361 (1918)
116. M.Laskowski jr., H.A.Scheraga, Thermodynamic considerations of protein denaturation, *J.Amer.Chem.Soc.* 83, 266 (1961)
117. M.A.Lauffer, R.B.Dow, The denaturation of tobacco mosaic virus at high pressures, *J.Biol.Chem.* 140, 509 (1941)

118. I.I.Lenarskii, Denaturation of proteins and drying and heat-treatment of cereal grain, *Biokhim. Zerna i Khlebopecheniya* 1960, 75, zit. nach *Chem. Abstr.* 55, 23858 g (1961)
119. C.Lenti, S.Di Bella, The protective action of sodium caprylate on the denaturation of proteins by heat, *Arch.sci.biol. (Italy)* 36, 75 (1952), zit. nach *Chem. Abstr.* 49, 4751 e (1955)
120. J.Leopis, A.Albert, The viscoelastic behavior of monolayers of bovine serum albumin and gamma-globulin, *Anales real soc.espan.fis.y quim. (Madrid)* 55 B, 109 (1959), zit. nach *Chem. Abstr.* 53, 12791 c (1959)
121. J.Levitt, A sulfhydryl-disulfid hypothesis of frost injury and resistance in plants, *J.Theoret.Biol.* 3, 355 (1962), zit. nach *Chem. Abstr.* 58, 8231 d (1963)
122. M.Levy, A.E.Benaglia, The influence of temperature and pH upon rate of denaturation of ricin, *J.Biol.Chem.* 186, 829 (1950)
123. J.Lewin, P.Hillion, Fixation of iodoimercure by denatured proteins, *Compt.rend.soc.biol.* 141, 708 (1947), zit. nach *Chem. Abstr.* 42, 2294 i (1948)
124. O.V.Lobachevskaya, Antigen properties of native and denatured forms of egg albumin, *Ukrain.Biokhim.Thur.* 25, 28 (1953), zit. nach *Chem. Abstr.* 47, 12597 f (1953)
125. J.Loiseleur, Denaturation of proteins by secondary action of formaldehyde, *Compt.rend.soc.biol.* 136, 435 (1942), zit. nach *Chem. Abstr.* 37, 3774⁷ (1943)
126. K.Lorentz, Über den Einfluß der Denaturierung auf das Elektrophorese-diagramm, *Klin.Wschr.* 40, 527 (1962)
127. A.L.Loseva, Certain problems of stabilization of globular proteins, *Dopovidi Akad.Nauk.Ukr.R.S.R.* 1957, 137, zit. nach *Chem. Abstr.* 51, 18025 h (1957)
128. A.L.Loseva, A.S.Tsiperovich, Mechanism of protein denaturation. X. Effect of fatty acid anions on the stability of globular proteins to denaturation, *Colloid J. (USSR)* 19, 233 (1957), zit. nach *Chem. Abstr.* 52, 8244 h (1958)
129. R.Lumry, H.Eyring, Conformation changes of proteins, *J.Phys.Chem.* 58, 110 (1954)
130. L.M.Makarevich-Gal'perina, R.B.Bosis, Action of antimalarials in denaturation of protein, *Ukrain.Biokhim.Zhur.* 22, 445 (1950), zit. nach *Chem. Abstr.* 48, 2913 f (1954)
131. C.J.Martin, A.R.Frazier, The urea denaturation of alpha-chymotrypsin, *J.Biol.Chem.* 238, 3268 (1963)

132. C.J.Martin, A.R.Frazier, The urea denaturation of alpha-chymotrypsin in the presence of calcium, *J.Biol.Chem.* 238, 3869 (1963)
133. F.Mattace-Raso, G.Sarto, A.Loffredo, R.Santamaria, Denaturing action of urea and thiourea, *Boll.soc.ital.biol.sper.* 35, 279 (1959), zit. nach *Chem.Abstr.* 55, 18844 a (1961)
134. F.Mattace-Raso, R.Santamaria, G.Sarto, Protein denaturation with urea at high pH, *Boll.soc.ital.biol.sper.* 35, 840 (1959), zit. nach *Chem.Abstr.* 55, 23632 g (1961)
135. F.Mattace-Raso, R.Santamaria, A.Monaco, S.Mattace-Raso, Denaturation with urea of bovine serum albumin, *Boll.soc.ital.biol.sper.* 35, 844 (1959), zit. nach *Chem.Abstr.* 55, 23632 h (1961)
136. J.E.Matthews jr., R.B.Dow, A.K.Anderson, The effect of high pressure on the activity of pepsin and rennin, *J.Biol.Chem.* 135, 697 (1940)
137. R.H.Maybury, Urea denaturation of irradiated ovalbumin, *J.Phys.Chem.* 61, 140 (1957)
138. R.H.Maybury, J.J.Katz, Protein denaturation in heavy water, *Nature* 177, 629 (1956)
139. A.E.Mirsky, L.Pauling, Structure of native, denatured and coagulated proteins, *Proc.Nat.Acad.Sci.* 22, 439 (1936), zit. nach *Chem.Abstr.* 31, 3082 (1937)
140. A.Morawiecki, The effect of adenosinetriphosphate (ATP) on the heat denaturation of proteins, *Acta Biochim.Polon.* 1, 47 (1954), zit.nach *Chem.Abstr.* 49, 4053 e (1955)
141. H.E.Müller, F.Gramlich, Untersuchungen am natürlichen Serumproteinfilm der Erythrocytenoberfläche, *Acta haematol.* 29, 135 (1963)
142. H.E.Müller, F.Gramlich, Die normale Zusammensetzung des Plasma-proteinfilmes an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten, *Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.* 334, 103 (1963)
143. H.E.Müller, F.Gramlich, Ergänzende Untersuchungen zum Plasma-proteinfilm an der Oberfläche normaler, menschlicher Erythrocyten, *Naturwissenschaften* 50, 447 (1963)
144. H.E.Müller, F.Gramlich, Die normale Zusammensetzung des Plasma-proteinfilmes an der Oberfläche von Kaninchenerythrocyten, *Experientia (Basel)* 19, 571 (1963)
145. S.Nakagawa, T.Kaminaga, S.Araya, The stepwise nature of protein denaturation, *J.Biochem. (Tokyo)* 41, 371 (1954), zit. nach *Chem.Abstr.* 48, 12819 f (1954)

146. C. A. Nelson, J. P. Hummel, C. A. Swenson, L. Friedmann, Stabilization of pancreatic ribonuclease against urea denaturation by anion binding, *J. Biol. Chem.* 237, 1575 (1962)
147. H. Neurath, G. R. Cooper, J. O. Erickson, The denaturation of proteins and its apparent reversal, *J. Phys. Chem.* 46, 203 (1942)
148. H. Neurath, G. R. Cooper, J. C. Erickson, The denaturation of proteins and its apparent reversal, *J. Biol. Chem.* 142, 249 (1942)
149. H. Neurath, J. P. Greenstein, F. W. Putnam, J. O. Erickson, The chemistry of protein denaturation, *Chem. Revs.* 34, 157 (1944)
150. K. Okunuki, B. Hagihara, O. Matsubara, T. Nakayama, M. Yanagida, Denaturation and inactivation of enzyme protein, *Symposia on Enzyme Chem. (Japan)* 9, 1 (1954), zit. nach *Chem. Abstr.* 48, 7081 d (1954)
151. K. Okunuki, B. Hagihara, H. Matsubara, T. Nakayama, Denaturation and inactivation of enzyme proteins. I. Bacterial proteinase method for the determination of the ratio of denaturation of globular proteins, *J. Biochem. (Tokyo)* 43, 453 (1956), zit. nach *Chem. Abstr.* 50, 15607 f (1956)
152. J. Ollie, R. Pirie, H. Watson, Lipase and phospholipase activity in fish skeletal muscle and its relation to protein denaturation, *J. Sci. Food Agr.* 13, 501 (1962), zit. nach *Chem. Abstr.* 58, 4842 e (1963)
153. E. L. Opie, On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins, *J. Exptl. Med.* 115, 597 (1962)
154. A. G. Pasynskii, M. S. Volkova, V. P. Blokhina, Isotope method of determination of denaturational changes in proteins, *Doklady Akad. Nauk. S. S. S. R.* 101, 317 (1955), zit. nach *Chem. Abstr.* 49, 12577 a (1955)
155. F. Penati, P. Lovisetto, G. L. Turco, Hemoglobin in normal and pathological conditions. VII. Partial acid denaturation, *Haematologica (Pavia)* 39, 157 (1955), zit. nach *Chem. Abstr.* 50, 10227 g (1956)
156. G. Pfeleiderer, D. Jeckel, Th. Wieland, Zum Wirkungsmechanismus der Milchsäure-dehydrogenase, *Biochem. Z.* 329, 104 (1957)
157. P. Poszwinski, Erste Schritte bei der thermischen Denaturierung von Serumalbumin, *Angew. Chem.* 74, 35 (1962)
158. D. Pressman, L. A. Sternberger, The relative rates of iodination of serum components and the effect of iodination on antibody activity, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 2226 (1950)
159. T. I. Pristoupil, V. Fričová, E. Paluska, Die Untersuchung einiger serologischer, physikalischer und chemischer Eigenschaften von modifizierten Eiweißstoffen, *Z. Immunitätsf.* 125, 50 (1963)

160. R.O.Prudhomme, P.Grabar, Bull.soc.chim.biol. 29, 122 (1947), Denaturation of proteins. I. Action of ultrasonic vibrations on the proteins of normal horse serum and on the cyclic amino acids, zit. nach Chem.Abstr. 41, 6903 f (1947)
161. R.A.Rasmussen, Chemical tests on the degree of cooking of soybean flour, Aliment. animale 4, 349 (1960), zit. nach Chem.Abstr. 55, 831 g (1961)
162. G.Reske, Eiweißschädigung durch Tabakrauch in vitro und ihre Hemmung durch Filter aus reduzierter Wolle, Arzneimittelforschung 13, 913 (1963)
163. S.A.Rice, A.Wada, E.P.Geiduschek, Some comments on the theory of denaturation, Discussion Faraday Soc. 25, 130 (1958)
164. B.Robert, Denaturation of proteins. II. Oxydation of horse-serum albumin in alkaline media by various electron acceptors and significance of catalysis by metals, Bull.soc.chim.biol. 36, 253 (1954), zit.nach Chem.Abstr. 48, 12188 h (1954)
165. B.Robert, J.Polonovski, Denaturation of proteins. IV. Influence of pH on the rate of oxydation of proteins in alkaline media, Bull.soc. chim.biol. 36, 585 (1954), zit. nach Chem.Abstr. 49, 1114 a (1955)
166. P.Rondoni, Cancro e denaturazione delle proteine, Esperientia (Basel) 2, 127 (1946)
167. A.Rothen, K.Landsteiner, Serological reactions of protein films and denatured proteins, J.Exptl.Med. 76, 437 (1942)
168. R.V.Ryshova, Heat denaturation of proteins, Colloid J. (USSR) 4, 149 (1938), zit. nach Chem.Abstr. 33, 2152⁷ (1939)
169. T.V.Saenko, Is the process of protein denaturation accompanied by process of hydrolysis? Biokhim.Zhur. 29, 387 (1957), zit.nach Chem. Abstr. 52, 8237 f (1958)
170. A.P.Salchinkin, Denaturation of protein by heating, Colloid J.(USSR) 3, 281 (1937), zit.nach Chem.Abstr. 32, 5419⁵ (1938)
171. A.P.Salchinkin, Physical chemistry of the heat denaturation of proteins. I. Interaction of denatured and of native egg albumin with hydrogen and hydroxyl ions, Colloid.J. (USSR) 5, 467 (1939), zit.nach Chem.Abstr. 34, 925⁴ (1940)
172. G.Sandor, J.J.Perez, Denaturation of proteins and the reactivity of the phenol groups, Trav.membres soc.chim.biol. 24, 1163 (1942), zit. nach Chem.Abstr. 39, 1652³ (1945)

173. G.Sarto, F.Mattace-Raso, R.Santamaria, Lability to denaturation of the conalbumin fraction of the albumen system of egg, *Boll.Soc.Ital. Biol.Sper.* 35, 835 (1959), zit. nach *Chem.Abstr.* 55, 23632 e (1961)
174. H.A.Scheraga, L.F.Nims, *Biochim.et Biophys.Acta* 37, 336 (1960), The action of X-rays on fibrinogen solutions.
175. H.A.Scheraga, R.A.Scott, G.L.Loeb, A.Nakajima, J.Hermans jr., The sharpness of the transition in reversible protein denaturation, *J. Phys.Chem.* 65, 699 (1961)
176. H.Schuboth, *Serologie und Klinik der autoimmunhämolytischen Erkrankungen. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde.* Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959
177. K.Segal, Stufenweise Denaturierung von Eiweißen, *Acta biol. et med. germanicae* 10, 488 (1963)
178. I.Sekuzu, B.Hagihara, F.Hattori, T.Shibata, M.Nozaki, K.Okunuki, Denaturation and inactivation of enzyme proteins. V. Denaturation and inactivation of yeast alcohol and muscle glyceraldehyde-e-phosphate dehydrogenases, *J.Biochem. (Tokyo)* 44, 537 (1957), zit. nach *Chem. Abstr.* 52, 1302 g (1958)
179. E.W.Simon, Mechanism of dinitrophenol toxicity, *Biol.Revs. Cambridge Phil.Soc.* 28, 453 (1953), zit. nach *Chem.Abstr.* 48, 2233 a (1954)
180. R.B.Simpson, Dissertation: Study of protein denaturation by means of the optical rotatory power, zit. nach *Chem.Abstr.* 49, 11754 i (1955)
181. M.Spiegel-Adolf, G.C.Henny, X-ray diffraction analysis of protein denaturation. II. *J.Phys.Chem.* 46, 581 (1942)
182. J.Stauff, Denaturierung der Proteine, *Kolloid-Z.* 146, 48 (1956)
183. J.Stauff, H.Barthel, R.Jaenicke, R.Krekel, E.Üblein, Die Wärmeaggregation von Proteinen in Lösung, *Kolloid-Z.* 178, 128 (1961)
184. J.Stauff, E.Üblein, Kinetik der Protein-Denaturierung. Hitzedenaturierung des β -Lactoglobulins, *Kolloid-Z.* 143, 1 (1955)
185. K.I.Strachitskii, K.F.Firfarova, Changes in the viscosity of protein solutions during heat denaturation, *Biokhimiya* 18, 235 (1953), zit. nach *Chem.Abstr.* 47, 8133 a (1953)
186. K.I.Strachitskii, A.Yu.Kologrivova, Changes of optical activity and enzymic hydrolysis of proteins on denaturation, *Biokhimiya* 11, 385 (1946), zit. nach *Chem.Abstr.* 41, 2761 h (1947)
187. J.M.Sturtevant, The change in heat content accompanying denaturation, *J.Phys.Chem.* 58, 97 (1954)
188. C.Suzuki, K.Suzuki, Protein denaturation by high pressure. Changes of optocal rotation and susceptibility to enzymic proteolysis with ov-

- albumin denaturated by pressure, J.Biochem. (Tokyo) 52, 67 (1962), zit. nach Chem.Abstr. 58, 5917 a (1963)
189. C.Suzuki, K.Suzuki, The gelation of ovalbumin solutions by high pressures, Arch.Biochem.Biophys. 102, 367 (1963)
190. K.Suzuki, The kinetics of protein denaturation under high pressure, Rev.Phys.Chem.Japan 29, 91 (1960), zit. nach Chem.Abstr. 54, 2365 d (1960)
191. V.K.Tkach, Protein denaturation by urea studied by determination of high frequency electroconductivity temperature coefficient, Eksptl. i Klin.Issledovan. po Fizioterap. Sbornik 1959, 19, zit. nach Chem. Abstr. 55, 11501 f (1961)
192. M.P.Tombs, N.F.MacLagan, The effect of hydrolysis on the ultraviolet absorption of proteins near 210 mn, Biochem.J. 81, 41 P (1961)
193. V.S.Tongur, V.I.Kasatochkin, Reversibility of thermal denaturation of protein under pressure, Doklady Akad.Nauk. S.S.S.R. 74, 553 (1950), zit. nach Chem.Abstr. 45, 2039 (1951)
194. V.S.Tongur, V.I.Kasatochkin, Effect of high pressures on thermal denaturation of proteins, Khim. i Fiz. -Khim.Vysokomolekul.Soedinenii, Doklady 7-oi Konf.Vysokomolekul.Soedineniyam 1952, 124, zit. nach Chem.Abstr. 47, 12438 e (1953)
195. Y.Tonomura, Surface denaturation of spherical proteins, Science (Japan) 19, 565 (1949), zit. nach Chem.Abstr. 45, 8058 e (1951)
196. A.S.Tsiperovich, Mechanism of denaturation of protein. I. Stepwise character of the change of the protein molecule on denaturation, Ukrain.Biokhim.Zhur. 20, 108 (1948), zit. nach Chem.Abstr. 46, 10221 b (1952)
197. A.S.Tsiperovich, Mechanism of protein denaturation. III. Intermittent character of heat denaturation of serum and egg albumins, Ukrain.Biokhim.Zhur. 21, 44 (1949), zit. nach Chem.Abstr. 48, 8281 g (1954)
198. A.S.Tsiperovich, The mechanism of protein denaturation. V. Pseudo-equilibria in the denaturation of globular protein by urea, Ukrain.Biokhim.Zhur. 24, 26 (1952), zit. nach Chem.Abstr. 48, 5896 f (1954)
199. A.S.Tsiperovich, Nature of denaturational stabilization of globular proteins, Kolloid-Zhur. 21, 119 (1959), zit. nach Chem.Abstr. 53, 16651 d (1959)
200. A.S.Tsiperovich, Protein molecule denaturation as the result of modification of a single functional group, Ukrain.Biokhim.Zhur. 32, 173 (1960), zit. nach Chem.Abstr. 55, 7512 i (1961)

201. A.S.Tsiperovich, T.O.Galkina, Mechanism of denaturation of protein. VII. The effect of ions of salts on the denaturation of globular proteins, Ukrain.Biokhim.Zhur. 28, 127 (1956), zit. nach Chem.Abstr. 50, 15635 c (1956)
202. A.S.Tsiperovich, A.L.Loseva, The mechanism of protein denaturation. The properties of globular proteins, stabilized with the aid of a denaturing factor, Biokhimiya 21, 546 (1956), zit. nach Chem.Abstr. 51, 5864 h (1957)
203. A.S.Tsiperovich, A.L.Loseva, The mechanism of protein denaturation. The denaturation of spherical proteins without changes in viscosity or optical rotation, Ukrain.Biokhim.Zhur. 27, 494 (1955), zit. nach Chem.Abstr. 50, 4257 c (1956)
204. A.S.Tsiperovich, A.L.Loseva, The mechanism of protein denaturation. The character of denaturation and of related protein changes, Ukrain. Biokhim.Zhur. 28, 265 (1956), zit. nach Chem.Abstr. 51, 1338 d (1957)
205. G.Weber, Polarization of the fluorescence of macromolecules. Biochem.J. 51, 145 (1952)
206. U.Weiß, Mercaptoacetanilide derivatives, US-Patent 2520293 vom 29.8.1950, zit. nach Chem.Abstr. 46, 134 P (1952)
207. O.Westphal, Immunchemie, S.955 in Physiolog.Chemie II/2 b, Herausgeber: B.Flaschenträger, E.Lehnartz, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957
208. R.Wetzel, W.Eschke, W.Eckart, Mechanism of ultraviolet light inactivation of T₁-bacteriophage at different wavelength, zit. nach Chem. Abstr. 56, 3889 g (1962)
209. P.L.Whitney, C.Ranford, Solubility of amino acids in aqueous urea solutions and its implications for the denaturation of proteins by urea, J.Biol.Chem. 237, PC 1735 (1962)
210. K.L.Wolf, Physik und Chemie der Grenzflächen, Springer-Verlag Heidelberg 1957
211. K.Yamafuji, S.Fujii, T.Akita, Enzymologia 14, 24 (1950), zit. nach Chem.Abstr. 44, 8974 (1950): The chemical processes in artificial virus formation in vivo.

LEBENS LAUF

Am 26.3.1930 wurde ich, Hans Emil Müller, in Zweibrücken als erster von drei Söhnen des Oberstaatsanwaltes Dr. Emil Müller und seiner Frau Erna, geb. Küßwetter, geboren. Von 1936 an besuchte ich die Volksschule in Zweibrücken, bedingt durch Kriegs- und Nachkriegsereignisse 1939 die Volksschule in Ehingen/Mittelfranken, 1940 das humanistische Gymnasium in Mannheim, 1940 - 44 in Zweibrücken, 1945 - 49 in Worms, wo ich 1949 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1950 ab studierte ich Chemie an der Universität Mainz. Hier legte ich 1954 mein Diplom-Vorexamen in Chemie ab, ließ mich in die medizinische Fakultät einschreiben und bestand 1956 die ärztliche Vorprüfung. 1959 erhielt ich nach Durchführung einer Diplomarbeit über ein Thema der Pyridinchemie bei Professor Dr. D. Jerchel das Diplom in Chemie. 1959 - 61 arbeitete ich als Doktorand bei Professor Dr. W.Kern über Polyelektrolyte. Nach meiner Promotion bei der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Mainz bin ich seit 1961 als wissenschaftlicher Assistent bei Professor Dr. R.Duesberg in der I.Med.Klinik und Poliklinik tätig, im Januar 1964 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

